



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer: 0 365 818
A1.

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 89117109.2

⑭ Int. Cl. 5: G01N 33/53 , G01N 33/94 ,
G01N 33/577 , C12P 21/00

⑮ Anmeldetag: 15.09.89

Der Anmelder hat eine Erklärung nach Regel 28
(4) EPÜ (Herausgabe einer Probe nur an einen
Sachverständigen) eingereicht.

Eingangsnummer(n) der Hinterlegung(en):
ECACC 8808/2501, ECACC 8808/2502 and
ECACC 8808/2503.

⑯ Priorität: 19.09.88 CH 3480/88

⑰ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.05.90 Patentblatt 90/18

⑱ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑲ Anmelder: CIBA-GEIGY AG
Klybeckstrasse 141
CH-4002 Basel(CH)

⑳ Erfinder: Schlaeppli, Jean-Marc, Dr.
Auf der Lyss 22
CH-4051 Basel(CH)
Erfinder: Ramsteiner, Klaus, Dr.
Witterswilerstrasse 14
CH-4114 Hofstetten(CH)
Erfinder: Föry, Werner, Dr.
Inzlingerstrasse 11
CH-4125 Riehen(CH)

㉑ Vertreter: Zumstein, Fritz, Dr. et al
Bräuhausstrasse 4
D-8000 München 2(DE)

㉒ Immunologischer Nachweis von Atrazin und Atrazinderivaten.

㉓ Monoklonale Antikörper, die sich durch eine hohe Selektivität und Affinität gegenüber Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. gegenüber inaktiven Atrazinmetaboliten auszeichnen und die sich daher in hervorragender Weise für die Verwendung in einem Immunassay zum schnellen und effektiven Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten sowie von inaktiven Atrazinmetaboliten eignen. Ein weiterer Aspekt betrifft Hybridomazelllinien, die besagte monoklonale Antikörper produzieren sowie immunologische Verfahren zum Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten sowie von inaktiven Atrazinmetaboliten, unter Verwendung besagter monoklonaler Antikörper und die im Rahmen dieser Nachweisverfahren verwendbaren Testkits.

EP 0 365 818 A1

Immunologischer Nachweis von Atrazin und Atrazinderivaten

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind monoklonale Antikörper, die sich durch eine hohe Selektivität und Affinität gegenüber Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. gegenüber inaktiven Atrazinmetaboliten auszeichnen und die sich daher in hervorragender Weise für die Verwendung in einem Immunasay zum schnellen und effektiven Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten sowie von inaktiven Atrazinmetaboliten eignen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Hybridomazelllinien, die besagte monoklonale Antikörper produzieren sowie immunologische Verfahren zum Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten sowie von inaktiven Atrazinmetaboliten, unter Verwendung besagter monoklonaler Antikörper und die im Rahmen dieser Nachweisverfahren verwendbaren Testkits.

Der Einsatz synthetischer Herbizide für die Zwecke des Pflanzenschutzes und die damit in Zusammenhang stehenden Umweltbelastungen sind in jüngster Zeit immer häufiger in den Mittelpunkt der öffentlichen Diskussion gerückt.

s-Triazine und s-Triazinderivate wie Atrazin, Simazin oder Propazin werden seit der Entdeckung ihrer herbiziden Potenz in den 50iger Jahren in grossem Maßstab für die Zwecke des Pflanzenschutzes eingesetzt, insbesondere zur Bekämpfung einjähriger, breitblättriger Unkräuter sowie verschiedener Wildgräser in Maiskulturen.

Vorsichtige Schätzungen gehen davon aus, dass gegenwärtig Maisfelder in einer Größenordnung von 45 Millionen bis zu 100 Millionen Hektar mit s-Triazinen oder s-Triazinderivaten behandelt werden.

Es ist seit langem bekannt, dass s-Triazine, wie z.B. Atrazin, Simazin oder Propazin im Boden und anderen Biotopen nur relativ langsam abgebaut werden.

Diese Persistenz der s-Triazine im Boden ist auch für den Landwirt von grosser Bedeutung. Bei der Verwendung von Atrazin in Aufwandmengen, wie sie z.B. in Maiskulturen notwendig sind, können bereits innerhalb einer Fruchtfolge Probleme bei atrazinempfindlichen Folgekulturen auftreten, sodass der Landwirt unter Umständen gezwungen ist, eine aufwendige Bodenanalyse im Labor durchführen zu lassen. Die dort angewandten Analyse-Verfahren sind äusserst zeit- und kostenintensiv, da sie an hochspezialisierte und aufwendige Apparaturen gebunden sind.

Aus den genannten Gründen muss es daher als eine vordringliche Aufgabe angesehen werden die bestehenden Nachweisverfahren für synthetische Herbizide, insbesondere auch für s-Triazine und s-Triazinderivate sowie für deren Abbauprodukte, zu verbessern, d.h. kostengünstigere, effizientere und leichter handhabbare Verfahren zu entwickeln, die auch ausserhalb des Labors unter Feldbedingungen angewendet werden können und die beispielsweise dem Landwirt schnell und zuverlässig Informationen darüber liefern, ob und in welchen Konzentrationen ein bestimmter Wirkstoff oder Metabolit z.B. im Boden oder Wasser vorliegt.

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Möglichkeit zur Differenzierung des aktiven Wirkstoffs gegenüber seinen inaktiven Abbauprodukten, da nur so eine quantitative Bestimmung des tatsächlich noch im Boden vorhandenen Wirkstoffanteils möglich ist.

Der Nachweis von Atrazin und dessen Hauptabbauproduktes Hydroxyatrazin in Boden- und Wasserproben erfolgte früher in erster Linie mittels TLC (Dünnschicht-Chromatographie) sowie mit Hilfe spektroskopischer Methoden. Heute werden dagegen in der Hauptsache HPLC ('High Pressure Liquid Chromatography') (Ramsteiner und Hörmann, 1979) und GC- (Gas Chromatographie) (Ramsteiner K, 1985) Verfahren verwendet.

All die genannten Verfahren zum Nachweis synthetischer Herbizide sind jedoch mit zahlreichen Nachteilen verbunden. So müssen beispielsweise für die Bestimmung von Atrazin oder Hydroxyatrazin in Bodenproben mittels HPLC vor der Durchführung der eigentlichen chromatographischen Analyse aufwendige Reinigungs- und Aufkonzentrierungsschritte zwischengeschaltet werden.

Ein weiterer Nachteil der HPLC-Verfahren ist durch die Tatsache gegeben, dass dort photometrische Detektoren verwendet werden, die relativ unspezifisch sind. Neben der massenspektroskopischen Detektion beruhen die chromatographischen Analysen auf der Bestimmung von Retentionszeiten des jeweiligen Systems. Diese Werte sind aber relativ und damit nicht strukturspezifisch.

Die gaschromatographische Analyse des Hydroxyatrazins in Verbindung mit einer massenspektroskopischen Bestimmung ist aufgrund der geringen Flüchtigkeit dieser Verbindung nur mit erheblichem Aufwand durchführbar.

Um diese zuvor beschriebenen Nachteile der etablierten analytischen Verfahren zu vermeiden, hat man in jüngster Zeit versucht auch für den Agrarsektor immunologische Verfahren zu entwickeln, - wie sie in der klinischen Diagnostik zum Nachweis der verschiedensten Antigene bereits routinemässig eingesetzt werden

- , insbesondere für die quantitative und qualitative Bestimmung von Agrarchemikalien in Boden-, Wasser- oder Luftproben.

So hat man beispielsweise mittlerweile begonnen immunologische Verfahren für den Nachweis bestimmter Herbizide, wie 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Fleeker, 1986) oder Chlorsulfuron (Kelley et al, 5 1985) sowie verschiedener Pestizide, wie Diflubenzuron (Wie und Hammock, 1982), Metalaxyl (Newsome, 1985) oder Parathion (Ercegovich et al, 1981) zu entwickeln.

Auch für den immunologischen Nachweis von Atrazin ist bereits ein Verfahren beschrieben (US-P 10 4,530,786), das jedoch, wie auch die zuvor genannten Methoden, auf der Verwendung polyklonaler Antiseren beruht, die aus Tieren gewonnen werden, welche zuvor mit einem entsprechenden Antigen immunisiert wurden.

Polyklonale Antiseren sind in ihrer Zusammensetzung sehr heterogen, d.h. sie enthalten eine Vielzahl verschiedener Antikörper, die mit unterschiedlichen Epitopen des jeweiligen Antigens reagieren. Diese heterogene Zusammensetzung polyklonaler Antiseren kommt dadurch zustande, dass bei der Immunisierung eines Versuchstieres mit einem bestimmten Antigen immer mehrere Antikörperproduzierende Zellklone gleichzeitig stimuliert werden, von denen jeder ein anderes Epitop auf dem Antigenmolekül erkennt und daher von den stimulierten Zellklonen unterschiedliche Antikörper produziert werden.

Aus diesem Grund sind Immunsenzen immunisierter Tiere immer polyklonal und somit heterogen, sowohl was ihre Spezifität und als auch ihre Zugehörigkeit zu den einzelnen Klassen von Immunglobulinen angeht.

Diese Heterogenität in der Zusammensetzung polyklonaler Antiseren kann daher dazu führen, dass 20 strukturell nahe verwandte Verbindungen, wie beispielsweise das Atrazin und dessen Hauptabbauprodukt Hydroxyatrazin bei der Verwendung polyklonaler Antikörper im Rahmen eines Immunassays nicht in ausreichendem Masse differenziert werden können.

Die Aufgabe, die es im Rahmen dieser Erfindung zu lösen galt, betraf dagegen in erster Linie die Bereitstellung eines einfach handhabbaren, effektiven und in hohem Masse selektiven Immunassays für 25 einen schnellen und zuverlässigen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten sowie von inaktiven Atrazinabbauprodukten insbesondere aber von Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyatrazinderivaten, die eine Differenzierung von Atrazin und/oder Atrazinderivaten gegenüber ihren Abbauprodukten ermöglichen.

Diese Aufgabe konnte jetzt im Rahmen der vorliegenden Erfindung überraschenderweise gelöst werden und zwar durch die Bereitstellung von monoklonalen Antikörpern mit hoher Spezifität und Affinität für 30 Atrazin und/oder Atrazinderivate sowie durch die Bereitstellung von monoklonalen Antikörpern mit hoher Spezifität und Affinität für die Abbauprodukte von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber für die Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, wie z.B. Hydroxyatrazin, Hydroxysimazin, Hydroxypropazin etc., unter Verwendung der an sich bekannten Hybridoma/monoklonalen Antikörper-Technologie.

35 Die Verwendung hybrider somatischer Zelllinien (Hybridomas) als Quelle für Antikörper gegen ganz bestimmte Antigene geht auf die Arbeiten von Köhler und Milstein (Nature 256: 495-97, 1975) zurück.

Die Antikörper, die sich mit dem dort beschriebenen Verfahren gewinnen lassen, unterscheiden sich sehr stark von denjenigen, die man aus Antiseren konventionell immunisierter Tiere erhält.

Das Prinzip der Hybridoma/monoklonalen Antikörper-Technologie gründet sich auf die Beobachtung, 40 dass beim Verschmelzen zweier somatischer Zellen die resultierende Hybridzelle charakteristische Merkmale beider Elterntypen aufweist.

Im Falle der monoklonalen Antikörperproduktion stammt die Fähigkeit zur Synthese des spezifischen Antikörpers von einer immunkompetenten B-Zelle (gewöhnlich einer Milzzelle), die einem zuvor immunisierten Donor-Tier entnommen wurde, während die Fähigkeit zur kontinuierlichen Zellteilung in Kultur durch den 45 anderen Fusionspartner, eine Tumorzelllinie (oft ein Myeloma) beigesteuert wird.

Jede dieser Hybrid-Zelllinien synthetisiert ein homogenes Immunglobulin, das nur einen einzigen Vertreter aus der grossen Anzahl möglicher Antikörper repräsentiert, die von einem Tier als Antwort auf ein Antigen *in vivo* synthetisiert werden kann.

Da jeder Immunglobulin-produzierende Klon durch einen einzigen Typ von Antikörpern charakterisiert 50 wird, hat sich die Bezeichnung monoklonale Antikörper eingebürgert.

Die Vorteile monoklonaler gegenüber polyklonalen Antikörpern sind zahlreich:

- a) monoklonale Antikörper können in grosser Anzahl und in hohem Reinheitsgrad erhalten werden,
- b) die Herstellung monoklonaler Antikörper ist homogen im Hinblick auf die Antigen-Reaktivität und ändert sich auch nicht im Verlaufe der Zeit,
- c) monoklonale Antikörper produzierende Hybridomas können über Jahre und Jahrzehnte hinweg aufbewahrt werden, ohne dabei ihre spezifischen Eigenschaften, i.e. die Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper, zu verlieren,
- d) monoklonale Antikörper sind für die Verwendung als Standardreagenzien besser geeignet als

polyklonale Antiseren, da letztere negativ beeinflusst werden durch eine grosse Variationsbreite beispielsweise im Hinblick auf

- 5 a) die Blutentnahme immunisierter Tiere zur Gewinnung des Antiserums,
- b) eine ständige Verfügbarkeit von Material für zusätzliche Immunisierungen,
- c) die begrenzte Lebenszeit der Donortiere.

Monoklonale Antikörper, die mittlerweile gegen eine Vielzahl von Antigenen hergestellt wurden, sind in erster Linie in der medizinischen Diagnostik gut etabliert und aus dieser nicht mehr wegzudenken.

Die Verwendung monoklonaler Antikörper auf dem Agrarsektor beschränkte sich dagegen bisher in erster Linie auf das Screening von Pflanzenkrankheiten und die Entwicklung von Vakzinen für Nutztiere.

- 10 Im Zusammenhang mit Pflanzenkrankheiten wurden beispielsweise von Hsu H.T., et al. (ASM News, 50(3): 91-101, 1984) insgesamt 18 Spezies von Pflanzenviren aufgelistet, gegen die monoklonale Antikörper entwickelt wurden, darunter "Carnation Etched Ring Virus", "Potato Leaf Roll Virus", "Southern Bean Mosaik Virus", Tabak Mosaik Virus, "Tomato Ring Spot Virus" sowie "Tulip Breaking Virus".

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es jetzt erstmals gelungen unter Anwendung der an sich bekannten und zuvor kurz beschriebenen Hybridoma/monoklonalen Antikörper-Technologie sowohl monoklonale Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität für Atrazin und/oder Atrazinderivate als auch monoklonale Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität für inaktive Abbauprodukte von Atrazin und/oder Atrazinderivaten zur Verfügung zu stellen, die aufgrund ihrer hohen Spezifität und der dadurch bedingten geringen gegenseitigen Kreuzreaktivität in hervorragender Weise für eine Verwendung in einem Immunassay zum schnellen und zuverlässigen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten auf der einen sowie von deren inaktiven Abbauprodukten auf der anderen Seite geeignet sind und die damit auch für eine Differenzierung von Atrazin und/oder Atrazinderivaten gegenüber ihren inaktiven Metaboliten verwendet werden können.

20 Die vorliegende Erfindung betrifft somit in erster Linie monoklonale Antikörper und deren Derivate, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweisen und die im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Metaboliten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber keine Kreuzreaktivität mit den inaktiven Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, zeigen.

25 Ein weiterer Gegenstand dieser Anmeldung betrifft monoklonale Antikörper und deren Derivate, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber den inaktiven Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweisen, insbesondere gegenüber den Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, und die im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigen.

30 Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung sind monoklonale Antikörper und deren Derivate, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin aufweisen und die im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Hydroxyatrazin oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten, wie Hydroxysimazin, Hydropropazin usw. zeigen.

35 Ebenfalls bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung sind monoklonale Antikörper und deren Derivate, die eine hohe Spezifität gegenüber Hydroxyatrazin aufweisen und die im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Atrazin oder Atrazinderivaten zeigen, wie z.B. Propazin, Simazin, Ametryn, Atraton u.a.

40 Ebenfalls umfasst von der vorliegenden Erfindung sind monoklonale Antikörper und deren Derivate, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin aufweisen und die eine stark ausgeprägte Kreuzreaktivität, insbesondere aber eine Kreuzreaktivität von mehr als 50 %, vorzugsweise von mehr als 80 %, mit bestimmten strukturell ähnlichen Atrazinderivaten zeigen, insbesondere mit solchen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Propazin, Prometryn und Prometon, die aber im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit anderen Atrazinderivaten oder mit Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigen.

45 Ein weiterer Gegenstand dieser Anmeldung betrifft monoklonale Antikörper und deren Derivate, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Hydroxyatrazin aufweisen und die eine Kreuzreaktivität, insbesondere aber eine Kreuzreaktivität von wenigstens 40 %, mit verschiedenen Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten zeigen, die aber im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigen.

50 Ganz besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung sind monoklonale Antikörper und deren Derivate, die eine hohe Spezifität gegenüber Hydroxyatrazin aufweisen und die eine stark ausgeprägte Kreuzreaktivität, insbesondere aber eine Kreuzreaktivität von bis zu 100 %, mit dem strukturell sehr ähnlichen Hydroxypropazin zeigen, die aber im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Atrazin oder Atrazinderivaten aufweisen, wie z.B. Propazin, Simazin, Ametryn, Atraton u.a. sowie mit Hydroxy-Analogen von Atrazinderivaten, wie Hydroxysimazin, Hydroxydesmetryn, Hydroxyterbutylazin usw. aufweisen.

55 Unter Derivaten monoklonaler Antikörper sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung z.B. Antikörperfragmente zu verstehen, die noch die hohe Spezifität und Affinität für die antigenen Determinanten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten besitzen, desweiterten radioaktiv markierte monoklonale Antikörper, die beispielsweise mit radioaktivem Jod

- (^{125}I , ^{131}I) Kohlenstoff (^{14}C), Schwefel (^{35}S), Tritium (^3H) oder ähnlichem markiert sind, Konjugate monoklonaler Antikörper mit Biotin oder Avidin, mit Enzymen, wie Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase, β -D-Galaktosidase, Glucoseoxidase, Glucoamylase, Carbonsäureanhydrase, Acetylcholinesterase, Lysozym, Malatdehydrogenase oder Glucose-6-phosphatdehydrogenase, desweiteren Konjugate monoklonaler Antikörper mit biolumineszierenden (z.B. Luciferase), chemolumineszierenden (z.B. Acridiniumester) oder fluoreszierenden (z.B. Phycoobiliproteine) Agentien. Ebenso umfasst von der vorliegenden Anmeldung sind bispezifische sowie sog. "cross-linked" Antikörper. Diese beispielhafte Aufzählung möglicher Antikörperderivate dient lediglich der Illustration der vorliegenden Erfindung und soll den Erfindungsgegenstand in keiner Weise limitieren.
- 10 Unter der Bezeichnung "im wesentlichen keine Kreuzreaktivität" soll im Rahmen dieser Erfindung verstanden werden, dass die Reaktivität der für Atrazin bzw. Hydroxyatrazin spezifischen monoklonalen Antikörper mit unspezifischen Epitopen anderer Verbindungen, insbesondere strukturell verwandter Verbindungen weniger als 20 %, vorzugsweise aber weniger als 5 % und ganz besonders bevorzugt weniger als 1 % beträgt.
- 15 Der prozentuale Anteil der Kreuzreaktivität soll im Rahmen dieser Erfindung definitionsgemäß durch die folgende Beziehung wiedergegeben werden:
- (Atrazin/Hydroxyatrazinkonzentration für 50 % Hemmung/Konzentration der s-Triazin-/Hydroxytriazinanalogen für 50 % Hemmung) x 100.
- Eine 50 %ige Hemmung kann beispielsweise mit Hilfe eines kompetitiven ELISA Assays (vgl. Beispiel 20 8) bestimmt werden. Diese entspricht dann beispielsweise derjenigen Antigenkonzentration, die zu einer 50 %igen Hemmung der Antikörperbindung an das Träger-gebundene Antigen führt.
- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Hybridomazelllinien, welche die zuvor näher charakterisierten monoklonalen Antikörper synthetisieren und vorzugsweise in das umgebende Medium sezernieren.
- 25 Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung eine Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweist und der im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit den inaktiven Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigt.
- Ebenso umfasst ist eine Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine 30 hohe Spezifität und Affinität gegenüber den Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweist und der im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigt.
- Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung betrifft eine Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin aufweist und der im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Hydroxyatrazin oder anderen Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten 35 zeigt.
- Besonders bevorzugt ist eine Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper synthetisiert und in das umgebende Medium sezerniert, der eine hohe Spezifität und Affinität für Atrazin besitzt und der eine sehr stark ausgeprägte Kreuzreaktivität, insbesondere aber eine Kreuzreaktivität von mehr als 50 %, vorzugsweise von mehr als 80 %, mit strukturell ähnlichen Atrazinderivaten zeigt, insbesondere mit solchen, 40 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Propazin, Prometryn und Prometon, der aber im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit anderen Atrazinderivaten sowie mit Hydroxyatrazin oder Hydroxy-Analogen von Atrazin-Derivaten zeigt.
- Ganz besonders bevorzugt ist eine Hybridomazelllinie, welche die kennzeichnenden Charakteristika von 45 ECACC 8808/2501 besitzt, sowie deren Klone und Subklone.
- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Hydroxyatrazin aufweist und der im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigt.
- Ebenfalls besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist eine Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper synthetisiert, der eine hohe Spezifität und Affinität für Hydroxyatrazin besitzt und 50 der eine Kreuzreaktivität, insbesondere aber eine Kreuzreaktivität von mehr als 40 %, mit strukturell ähnlichen Verbindungen, wie Hydroxysimazin, Hydroxypropazin und Hydroxydesmetryn, aufweist, der aber im wesentlichen keine Kreuzreaktivität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweist.
- Ganz besonders bevorzugt ist eine Hybridomazelllinie, welche die kennzeichnenden Charakteristika von 55 ECACC 8808/2502 besitzt, sowie deren Klone und Subklone.
- Ebenfalls bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist eine Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper synthetisiert und in das umgebende Medium sezerniert, der eine hohe Spezifität und Affinität für Hydroxyatrazin aufweist und der eine stark ausgeprägte Kreuzreaktivität insbesondere aber eine Kreuzreaktivität von bis zu 100 %, mit dem strukturell sehr ähnlichen Hydroxypropazin zeigt, der aber im wesentlichen

chen keine Kreuzreaktivität mit anderen Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten, wie beispielsweise Hydroxysimazin, Hydroxydesmetryn oder Hydroxyterbutylazin, sowie mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweist.

Ganz besonders bevorzugt ist eine Hybridomazelllinie, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2503 besitzt, sowie deren Klone und Subklone.

Ebenso umfasst von der vorliegenden Erfindung sind Varianten und Mutanten der zuvor naher charakterisierten Hybridomazelllinien, die spontan entstehen oder aber artifiziell mit Hilfe bekannter Verfahren hergestellt werden können und die noch die charakteristischen Eigenschaften des Ausgangsmaterials aufweisen, d.h. die noch in der Lage sind die erfindungsgemäßen Antikörper oder Derivate davon zu produzieren und ins umgebende Medium zu sezernieren.

Ebenso umfasst von der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Herstellung besagter Hybridomazelllinien sowie Verfahren zur Herstellung besagter monoklonaler Antikörper.

Unter Klonen und Subklonen von Hybridomazelllinien sind Hybridomas zu verstehen, die durch wiederholtes Klonieren aus dem Ausgangsklon hervorgehen und die noch die erfindungswesentlichen Merkmale des Ausgangsklons aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung betrifft ein Verfahren zum immunologischen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, z.B. in Boden-, Wasser- oder Luftproben sowie in biologischem Material, wie z.B. in pflanzlichen oder tierischen Extrakten, unter Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum immunologischen Nachweis von Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten, z.B. in Boden-, Wasser- oder Luftproben sowie in biologischem Material, wie z.B. in pflanzlichen oder tierischen Extrakten, unter Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper.

Ganz besonders bevorzugt ist ein Verfahren zum Nachweis von Hydroxyatrazin.

Ebenso ein Bestandteil der vorliegenden Erfindung sind Mittel für die qualitative und quantitative Bestimmung von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. von Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber von Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, wie z.B. Hydroxyatrazin, Hydroxypropazin, Hydroxysimazin etc. in Form gebrauchsfertiger Test-Kits, welche mindestens einen der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper als Reagenz enthalten und die für die Verwendung unter Feldbedingungen für einen schnellen und zuverlässigen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, sowie von Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber von Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten, geeignet sind.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper erfolgt mit Hilfe an sich bekannter Verfahren, die im wesentlichen auf den von Köhler und Milstein (Nature, 256: 495-497, 1975) entwickelten Methoden beruhen.

Da es sich bei den zu analysierenden Zielsubstanzen Atrazin und Hydroxyatrazin, für die spezifische monoklonale Antikörper entwickelt werden sollen, um relativ kleine und einfache Moleküle handelt, die nach der Applikation in ein Versuchstier alleine nicht in der Lage sind dort eine entsprechende Immunantwort auszulösen, müssen vor der eigentlichen Immunisierung zunächst vorbereitende Massnahmen getroffen werden.

Man bezeichnet solche Verbindungen, die aufgrund ihrer Grösse und einfachen Strukturierung nicht zur Induktion einer Immunreaktion in der Lage sind, als Haptene oder inkomplette Antigene und stellt sie somit den kompletten Antigenen (= Immunogene) gegenüber, die sowohl als Antigen wirken als auch eine Immunantwort zu induzieren vermögen. Solche Haptenmoleküle können an hochmolekulare Verbindungen (Trägermoleküle) konjugiert werden, wodurch sie in ihren Eigenschaften kompletten Antigenen vergleichbar werden, d.h. sie besitzen jetzt die Fähigkeit zur Auslösung einer Immunantwort.

Einige der im Verlaufe der Immunisierungsreaktion gebildeten Antikörper sind dann in der Lage mit spezifischen Epitopen auf dem Haptenmolekül zu reagieren, unabhängig davon, ob das Haptenmolekül alleine oder aber nach wie vor gekoppelt an das Carriermolekül vorliegt.

Unter der im folgenden häufig verwendeten Bezeichnung Hapten sollen im Rahmen dieser Erfindung in erster Linie die für die Immunisierung verwendeten Atrazin- und Hydroxyatrazin-Moleküle verstanden werden.

Im Rahmen dieser Erfindung werden daher die als Haptene wirkenden Atrazin- und Hydroxyatrazinmoleküle vor der Immunisierung von Versuchstieren an einen hochmolekularen Träger ('Carrier') gekoppelt, der geeignet ist besagten Atrazin- und Hydroxyatrazinmolekülen eine komplett antigene Wirksamkeit zu verleihen.

Unter geeigneten Carrier-Molekülen sind im Rahmen dieser Erfindung in erster Linie makromolekulare Verbindungen zu verstehen, die frei zugängliche reaktive Gruppen für die Kupplungsreaktion mit dem

Haptens aufweisen und die in der Lage sind, durch Kupplung an das Hapten, diesem eine immunogene Potenz zu verleihen oder aber deren bereits vorhandene Immunogenität zu verstärken.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung sind makromolekulare Verbindungen, die frei zugängliche reaktive Aminogruppen enthalten.

- 5 Ganz besonders bevorzugt für die erfundungsgemäße Verwendung als Carriermolekül sind lysinreiche Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10'000 und 1'500'000, wie z.B. "Bovine Serum Albumin" (BSA; MG 66' 200), Humanes Serum Albumin (HSA; MG 58'000) oder "Keyhole Limpet Protein" (KLH; MG 1'000'000), die kommerziell erhältlich sind und somit in beliebiger Menge zur Verfügung stehen.

- 10 Selbstverständlich können im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch andere makromolekulare Verbindungen als Carrier-Moleküle verwendet werden, sofern sie die oben genannten Voraussetzungen erfüllen, wie z.B. "Porcine Thyroglobulin", B2 Microglobulin, Hemocyanin, Immunglobuline, Toxine (Cholera-, Tetanus-, Diphtheria-Toxin u.a.), Polysaccharide, Lipopolysaccharide, natürliche oder synthetische Polyadenyl- und Polyuridylsäuren, Polyalanyl- und Polylysyl-Polypeptide oder Zellmembrankomponenten, wie beispielsweise Formalin- oder Glutaraldehyd-behandelte Erythrozytenzellmembranen.

- 15 Ebenso geeignet für die Verwendung als Carriermolekül in dem erfundungsgemäßen Verfahren ist beispielsweise die gereinigte IgG Fraktion gegen Maus IgG (H+L) aus Kaninchen gemäß dem bei H Kawamura und JA Berzofsky (*J. Immunol.*, 136: 58, 1986) beschriebenen Verfahren.

Die Konjugation des Haptens an das Trägermolekül kann entweder direkt oder aber vorzugsweise über ein Brückenglied erfolgen, welches gegebenenfalls zunächst an das Haptenmolekül angelagert wird.

- 20 Die Kupplung der zu analysierenden Substanz an das Trägermolekül muss dabei in einer Weise erfolgen, dass die relevanten Strukturelemente der Zielsubstanzen frei zugänglich bleiben und somit in der Lage sind eine spezifische Immunantwort auszulösen, d.h. die Bildung spezifischer Antikörper zu induzieren.

- Als Brückenglieder für eine Konjugation des Haptens (Atrazin und/oder Atrazinderivate sowie die 25 Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten) an das Carriermolekül kommen in erster Linie Verbindungen in Betracht, die mindestens eine oder aber mehrere reaktive Gruppen enthalten, welche in der Lage sind mit den frei zugänglichen reaktiven Gruppen des Carrier-Moleküls in Wechselwirkung zu treten.

- 30 Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung von Brückengliedern die zwischen 3 und 10 Brücken-C-atome umfassen und die als reaktive Gruppe(n) eine oder mehrere reaktive Gruppen, wie z.B. Amino-, Carboxyl- oder SH-Gruppe(n) besitzen.

Diese reaktiven Gruppen können mit Hilfe an sich bekannter Verfahren mit den reaktiven Gruppen des Hapten- und Carrier-Moleküls zur Reaktion gebracht werden, unter Ausbildung eines Hapten-Carrier-Konjugates.

- 35 So ist es beispielsweise möglich ein Brückenglied über eine reaktive Aminogruppe mit Hilfe von Dialdehyden (z.B. Glutardialdehyd) an eine der freien Aminogruppen des Carrier-Moleküls zu binden.

Besitzt das Brückenglied eine reaktive SH-Gruppe, so kann die Konjugation des Haptens an das Carrier-Molekül durch eine Oxidation mit freien SH-Gruppen des Carriers durchgeführt werden.

- 40 Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung von Brückengliedern mit einer Carboxylgruppe, die mit Hilfe von wasserbindenden Mitteln, wie beispielsweise einem Carbodiimid, vorzugsweise N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, mit einer freien Aminogruppe des Carriermoleküls verknüpft werden kann.

- 45 In einer spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung geht man von Atrazin, Hydroxyatrazin oder einem ihrer Derivate, vorzugsweise von 2,6-Dichlor-4-(isopropylamino)-s-triazin aus und setzt dies mit δ-Amino-valeriansäure um unter Bildung von 2-Chlor-4-(isopropylamino)-6-(δ-amino-valeriansäure)-s-triazin. Diese Verbindung kann dann mit Hilfe bekannter Methoden, wie z.B. durch Zugabe von wässrigen Mineralsäuren, in einem weiteren Reaktionsschritt sehr einfach in das entsprechende Hydroxy-Analoge umgewandelt werden.

- 50 Die Durchführung der eigentlichen Kupplungsreaktion erfolgt vorzugsweise mit Hilfe der aktiven Estermethode. Dabei werden die Atrazin- bzw. Hydroxyatrazinderivate zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel solubilisiert. Als geeignete Lösungsmittel kommen insbesondere aprotische Lösungsmittel, die eine geringe Verdampfungsraten aufweisen, wie z.B. N,N-Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) in Betracht.

- 55 Anschliessend werden die Carboxylgruppen zu einem aktiven Ester derivatisiert, indem die zuvor solubilisierten Atrazin- und/oder Hydroxyatrazinderivate z.B. mit N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxysulfosuccinimid, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid oder N,N'-Carbonyldiimidazol oder mit Derivaten dieser Verbindungen zur Reaktion gebracht werden.

Der aktive Ester wird dann aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt und zu BSA oder KLH zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 0,1 bis 12 Stunden vorzugsweise von 4 bis 5 Stunden wird das Präzipitat entfernt. Der Ueberstand kann dann gegebenenfalls nach Zwischenschaltung weiterer Reinigungsschritte für die eigentliche Immunisierungsreaktion verwendet werden.

Neben der im Rahmen dieser Erfindung bevorzugten aktiven Estermethode, können auch alternative Verfahren für die Kupplung des Haptens an das Carrier-Molekül verwendet werden, wie z.B. die gemischte Anhydridmethode. Dabei wird die Carboxylgruppe des Brückengliedes unter Verwendung von Essigsäure-anhydrid oder des Carbodimidderivates 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid an das Carrier-Molekül geknüpft.

Die Immunisierung der Donortiere erfolgt durch eine ein- bis mehrmalige Applikation der an ein hochmolekulares Trägermolekül gekoppelten Haptene. Besonders bevorzugt ist eine 2 bis 3 malige Applikation, die in Abständen von 7 bis 30 Tagen insbesondere aber von 13 bis 15 Tagen erfolgt.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugte Applikationsform ist die Injektion, die sowohl intravenös, intraperitoneal oder subcutan erfolgen kann.

Bevorzugt ist eine Kombination von subcutaner und intraperitonealer Injektion.

Nach einer Ruheperiode von 0,5 bis 4 Monaten erfolgt eine weitere einmalige Applikation des Haptenkonjugates in einer Dosierung von 100 µg bis 1000 µg.

In einem Zeitraum von 1 bis 6 Tagen nach der letzten Dosierung werden die Donortiere getötet und es wird eine Milzzellsuspension hergestellt.

Die isolierten Milzzellen werden dabei in einem geeigneten Puffer (z.B. einem BSS-Puffer) suspendiert und bis zu ihrer Fusion mit geeigneten Myeloma-Zellen in Form einer Zellsuspension aufbewahrt.

Anfänglich wurden diese Fusionen dadurch kompliziert, dass auch die Myeloma-Zelllinien monoklonale Antikörper synthetisierten, so dass das Hybrid zwei Typen monoklonaler Antikörper produzierte, einen, der seinen Ursprung in der Myeloma-Zelle hatte und einen zweiten, der durch die genetische Information der immunokompetenten Zelle bestimmt wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden daher vorzugsweise solche Tumorzellen verwendet, die selbst keine monoklonale Antikörper herstellen können, wie z.B. SP2/0-Ag14 (Shulman et al, 1978) oder X63-Ag8.653, wodurch die Analyse der resultierenden Fusionsprodukte sehr stark vereinfacht wird. Für den Fusionserfolg ist es vorteilhaft, wenn die Milzzellen in einem 2 bis 20fachen Ueberschuss im Verhältnis zu den Myelomzellen vorliegen.

Die Fusion von Milz- und Myelomzellen wird in einem speziellen Fusionsmedium durchgeführt, das eine Zusammensetzung aufweist, die für die beabsichtigte Zellfusion optimale Voraussetzungen liefert.

Vorzugsweise handelt es sich bei besagtem Fusionsmedium um eine Pufferlösung, die einen der üblicherweise für die Fusionierung von Zellen verwendeten Fusionspromotoren enthält, wie z.B. Sendai-Viren oder andere Paramyxoviren, gegebenenfalls in UV-inaktivierter Form, Calcium-Ionen, oberflächenaktive Lipide, wie z.B. Lysolecithin oder Polyethylenglykol. Besonder bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung von Polyethylenglykol (PEG), insbesondere von Polyethylenglykol (PEG) mit einem mittleren MG von 600 bis 6000, und in einer Konzentration von 30 % bis 60 %. Besonders bevorzugt ist eine PEG-Konzentration von 40 % - 50 %. Die optimale Fusionstemperatur beträgt zwischen 18 °C und 39 °C. Besonders bevorzugt ist eine Temperatur von 37 °C.

Nach der erfolgten Fusion der immunkompetenten Milzzellen mit den Myeloma-Zellen werden die fusionierten Antikörper-produzierenden Hybridzellen mit Hilfe an sich bekannter Verfahren selektiert.

Für das Auslesen erfolgreicher Fusionsergebnisse (Hybridzellen) aus den 2 Typen von Elternzellen existieren verschiedene Möglichkeiten. Routinemässig werden eine Million und mehr Zellen von jedem Elterntyp in dem Fusionsprotokoll verwendet. Da die Fusion nicht mit einer 100 %igen Frequenz erfolgt, kann es zu einem schwierigen Unterfangen werden, die Fusionsprodukte von der grossen Ueberzahl nicht fusionierter oder mit sich selbst fusionierter Elternzellen abzutrennen.

Wie bereits zuvor erwähnt, entstehen die Hybridomazellen durch Fusion kurzlebiger Antikörper produzierender (Milz) B-Zellen sowie langlebiger Myeloma Zellen.

Das gewünschte Resultat ist eine langlebige Zelllinie, die Antikörper produziert. Da die Milzzellen nur eine begrenzte Lebenszeit in Kultur besitzen, kann man daher im Prinzip einfach abwarten, bis alle nichtfusionierten sowie alle mit sich selbst fusionierten Milzzellen abgestorben sind. Dann bleibt jedoch immer noch die Aufgabe bestehen, die langlebigen Antikörper-produzierenden Zellen von den langlebigen nicht Antikörper-produzierenden Zellen abzutrennen.

Ein gängiges Selektionssystem basiert auf der Verfügbarkeit oder Nichtverfügbarkeit des Enzyms Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase (HPRT). Dieses Enzym ist Bestandteil des Purin "Salvage Pathway" in Säugerzellen.

Diese Zellen sind darüberhinaus auch in der Lage Purine *de novo* zu synthetisieren.

Unter normalen Umständen arbeiten wahrscheinlich beide Synthese-Wege bis zu einem gewissen

Grade parallel.

Falls eine Zelle jedoch kein HGPRT besitzt, ist der "Salvage Pathway" blockiert und die Purine müssen aus nicht-Purin Material hergestellt werden.

- Für die Selektion HGPRT-negativer Myelomazellen verwendet man in der Regel sog. Purin-Antimetabolite, wie z.B. das 8-Azaguanin, das dem Purin Guanin strukturell sehr ähnlich ist und dieses daher in einigen seiner normalen Reaktionen ersetzen kann.

Azaguanin wird in die DNA eingebaut, was zu einer Beeinträchtigung des normalen Wachstumsverhaltens und schliesslich zum Zelltod führt. Da Azaguanin über den "Salvage Pathway" ersetzt werden muss, können alle diejenigen Zellen, die keine HGPRT Aktivität besitzen, Azaguanin nicht verwertern und daher in dessen Gegenwart wachsen.

Ein selektives System, das mit demselben Enzym aber unter umgekehrten Vorzeichen arbeitet, indem in diesem Fall HGPRT positive Zellen selektiert werden, ist bei J.W. Littlefield (1964) beschrieben.

Dieses Selektionssystem basiert auf der Verwendung des sogenannten HAT-Mediums, das u.a. Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) als Bestandteile enthält. Aminopterin ist ein Antimetabolit, der die de novo Purin-Synthese sowie die Methylierung von Desoxyuridylat zu Thymidylat hemmt.

Hypoxanthin kann als Hilfspurin fungieren für den Fall, dass Aminopterin die de novo Purin-Synthese blockiert, während Thymidin die Notwendigkeit einer Methylierung von Desoxyuridylat überflüssig macht.

Daher werden in Gegenwart von Aminopterin alle HGPRT positiven Zellen proliferieren, während die HGPRT negativen Zellen absterben.

- In dem Hybridsystem, das im Rahmen dieser Erfindung für die Selektion verwendet wird, sind die Myeloma-Zellen vorzugsweise resistent gegenüber Azoguanin und empfindlich gegenüber Aminopterin, d.h. sie sind HGPRT negativ. Die Antikörper-produzierenden Zellen dagegen sind HGPRT positiv.

Durch Fusion der Zellen und Kultivierung in einem HAT-Medium, können die erfolgreich miteinander fusionierten Zellen selektiert werden, da die Myeloma-Zellen, die für die Proliferation verantwortlich sind, nur in Gegenwart einer HGPRT-Aktivität wachsen können und diese Aktivität von der HGPRT-positiven Zelllinie geliefert werden muss.

Die HGPRT-positiven Antikörper-produzierenden Zelllinien werden in diesem Medium zwar nicht abgetötet. Sie überleben aber nur eine bestimmte Zeit, und sind nicht in der Lage zu proliferieren.

- Damit wird durch Fusion der Zellen in einem HAT-Medium ein System geschaffen, in welchem zwar die Myeloma Zellen und die Antikörper produzierenden Zellen für einen Zeitraum wachsen können, der ausreicht für die Produktion von Hybrid-Zellen, in dem aber nur die Hybrid-Zellen überleben und proliferieren können.

In einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die fusionierten Hybridzellen in Gegenwart von zuvor aus dem Peritoneum unbehandelter, nicht-immunisierter Versuchstiere isolierten Macrophagen, sogenannter "Feederzellen", kultiviert. Für die Kultivierung und die Selektion der fusionierten Hybridzellen wird die Zellsuspension in mehrere Aliquots aufgeteilt und die einzelnen Aliquots werden ständig auf die Ausbildung von Hybridzellkulturen sowie auf die Bildung von Antikörpern hin untersucht.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Kultivierung der fusionierten Hybridzellen auf Mikrotiterplatten.

- Dabei wird die nach der Fusion erhaltene Zellsuspension auf die einzelnen Vertiefungen einer Mikrotiterplatte verteilt und für einen Zeitraum von 7 bis 30 Tagen unter geeigneten, das Wachstum der fusionierten Hybridzellen fördernden Bedingungen (z.B. HAT/HT-Medien) kultiviert.

Die Überstände gewachsener Hybridkulturen werden ständig auf die Bildung von Antikörpern hin untersucht.

- Positive Hybridzellkulturen werden dann mit Hilfe bekannter Verfahren, vorzugsweise aber mit Hilfe des limitierenden Verdünnungsverfahrens vereinzelt und anschliessend in geeigneten Kultivierungsmedien kloniert.

Die Überstände der gewachsenen Zellklone werden ebenfalls auf die Bildung von Antikörpern hin überprüft.

- Das Screening der gemäss der vorangegangenen Beschreibung hergestellten erfindungsgemässen Hybridoma-Zellklone auf die Bildung geeigneter monoklonaler Antikörper erfolgt vorzugsweise mit Hilfe eines der üblicherweise für diesen Zweck verwendeten Immunassays, wie z.B. einem Enzym-gekoppelten Immunassay oder einem Radioimmunassay.

Beim Enzym-gekoppelten Immunassay werden die zuvor näher charakterisierten Hapten-Konjugate zunächst an einen festen Träger adsorbiert. Die verbleibenden freien Bindungsstellen werden anschliessend durch Zugabe von Carriermolekülen abgesättigt und damit blockiert.

Zum Nachweis monoklonaler Antikörper werden Aliquots der Überstände besagter Hybridoma-Zellklone mit den Träger-gebundenen Haptenkonjugaten inkubiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Herstellung monoklonaler Antikörper unter Verwendung an sich bekannter Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass man die zuvor näher charakterisierten erfindungsgemässen Hybridomazelllinien oder aber Klone oder Subklone davon, welche die erfindungsgemässen Antikörper synthetisieren und in das umgebende Medium sezernieren, in vitro oder in vivo mit Hilfe bekannter Verfahren kultiviert.

Die in-vitro-Kultivierung der erfindungsgemässen Hybridoma-Zellen erfolgt in geeigneten Kultivierungsmedien, insbesondere in den üblicherweise verwendeten, standardisierten Kulturmedien wie z.B. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) oder RPMI 1640 Medium, die gegebenenfalls durch Zugabe von Säugerseren, wie z.B. Foetales Kälberserum, oder durch wachstumsfördernde Zusätze und Spurenelemente ergänzt werden können.

Die Isolierung der monoklonalen Antikörper beginnt vorzugsweise mit einer Präzipitation der Immunglobulinfraktion aus den jeweiligen Ueberständen der Hybridomakulturen, z.B. mit Hilfe von Ammoniumsulfat. Es schliessen sich weitere Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte an, die dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt sind und die beispielsweise die Verwendung chromatographischer Methoden, wie z.B. Gelfiltration, Ionen austausch-Chromatographie, DEAE-Cellulose Chromatographie, Protein A oder Immunaffinitätschromatographie miteinschliessen.

Grosse Mengen der erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper können aber auch mit Hilfe von in vivo Verfahren gewonnen werden.

So ist es beispielsweise möglich Antikörper-produzierende Hybridoma-Zellklone in geeignete Säugetiere zu injizieren, welche die Entwicklung von Antikörper-produzierenden Tumoren in den behandelten Tieren induzieren. Nach einem Zeitraum von 1 bis 3 Wochen können die Antikörper aus den Körperflüssigkeiten der so behandelten Tiere isoliert werden.

In einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird weiblichen Balb/c Mäusen, die gegebenenfalls mit einem Kohlenwasserstoff wie z.B. Pristan vorbehandelt wurden, ein erfindungsgemässer Hybridoma-Zellklon intraperitoneal injiziert.

Ein bis drei Wochen nach der Injektion des Hybridoma-Zellklons wird die Ascitesflüssigkeit gesammelt und bis zur weiteren Aufbereitung aufbewahrt.

Die Isolierung der monoklonalen Antikörper erfolgt in genau analoger Weise zu der zuvor beschriebenen Isolierung aus den Ueberständen in vitro kultivierter Hybridomas.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemässen Antikörper in einem der gebräuchlichen Immunassays zum Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. von inaktiven Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten sowie zur Differenzierung von Atrazin und/oder Atrazinderivaten gegenüber ihren inaktiven Abbauprodukten in Boden-, Luft- und Wasserproben sowie gegebenenfalls in Extrakten aus Pflanzen oder anderem biologischem Material.

Die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper können somit in allen bekannten Immunassays verwendet werden, die auf der spezifischen Bindung zwischen Antigen und dem entsprechenden monoklonalen Antikörper aufbauen, wie z.B. in einem Radioimmunassay (RIA), einem Enzym-gekoppelten Immunassay (ELISA), einem Immunfluoreszenz-Test etc.

Beim RIA Test kann der erfindungsgemässen monoklonale Antikörper als solcher oder aber in Form eines radioaktiv markierten Derivates verwendet werden. Dabei können alle bis heute bekannten Modifikationen des RIA Tests für den Nachweis der im Rahmen dieser Erfindung relevanten Zielsubstanzen verwendet werden, wie z.B. ein RIA Test in homogener oder fester Phase, ein heterogener RIA Test sowie ein einfacher oder doppelter ('Sandwich') RIA Test mit direktem oder indirektem (kompetitiven) Nachweis des Antigens. Das gleiche gilt auch für die Verwendung eines enzymgekoppelten Immunassays.

Bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemässen monoklonalen Antikörpers in einem kompetitiven Immunassay zum Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. ihrer Hydroxy-Analogen.

Das Prinzip des kompetitiven Immunassays beruht auf einer Konkurrenz zwischen einem markierten bzw. einem an einen festen Träger gebundenen Antigen und einem freien Antigen um die relevanten Bindungsstellen auf dem Antikörpermolekül.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Möglichkeiten zur Durchführung dieses kompetitiven Immunassays.

a) Das erste Verfahren beruht auf der Konkurrenz zwischen dem an einen festen Träger gebundenen Antigen und freiem Antigen um die freien Bindungsstellen auf dem Antikörper, der mit einem Marker versehen ist. Die Bindung des Antigens an einen festen Träger kann dabei entweder direkt oder aber über ein Carriermolekül erfolgen.

Die Bestimmung der Konzentration an freiem Antigen erfolgt in diesem Fall über die Abnahme des markierten, an das Träger-fixierte Antigen gebundenen Antikörpers.

Diese Abnahme ist proportional der in der Probe enthaltenen Menge an freiem Antigen.

- b) Ein alternatives Verfahren basiert darauf, dass freies und markiertes Antigen miteinander um die relevanten Bindungsstellen des Antikörpers konkurrieren, der in diesem Fall an einen festen Träger gebunden vorliegt.
- 5 Die Bestimmung der Konzentration an freiem Antigen erfolgt über die Abnahme an markiertem Antigen, die in Abhängigkeit von der Konzentration an freiem Antigen variiert.

Als festes Trägermaterial, das für die Bindung des Antigens oder des Antikörpers geeignet ist, kommen beispielsweise die Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte oder eines Teströhrchens, die Oberfläche von Kugeln aus Polystyren, Polypropylen, Polyvinylchlorid, Glas oder Kunststoff oder aber die Oberfläche von 10 Filterpapier-, Dextran-Cellulose- oder Nitrozellulose-Streifen oder ähnliche Materialien in Betracht. Diese werden mit einem der erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper oder einem Antigen überzogen, wobei die Bindung an das Trägermaterial durch einfache Adsorption oder aber gegebenenfalls nach vorangegangener Aktivierung des Trägermaterials mit z.B. Glutaraldehyd oder Cyanogenbromid vermittelt werden kann.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung des erfundungsgemäßen 15 monoklonalen Antikörpers in einem Enzym-gekoppelten Immunassay [ELISA ('Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)].

Dabei kann der erfundungsgemäße monoklonale Antikörper als solcher oder in Form eines Enzym-gekoppelten Derivates verwendet werden.

Der ELISA Assay basiert entweder auf der Verwendung eines Enzym-gekoppelten Derivates des 20 erfundungsgemäßen Antikörpers oder aber von an sich bekannten Enzym-gekoppelten Antikörpern, die ein Epitop eines erfundungsgemäßen Antikörpers erkennen und daran binden.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung eines ELISA-Assays, bei dem eines der zuvor beschriebenen Trägermaterialien zunächst mit einem Antigen beschichtet wird. Das 25 trägergebundene Antigen wird anschliessend mit einer Testlösung inkubiert, die das nachzuweisende Antigen sowie einen der erfundungsgemäßen Antikörper enthält. Das nachzuweisende Antigen kann dabei entweder in freier Form oder aber als Bestandteil einer Wasser- oder Bodenprobe vorliegen.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bis 2 Stunden wird der gesamte Ansatz mit einem enzymmarkierten Antikörper inkubiert, der den erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper erkennt und an diesen bindet. Ein Beispiel eines solchen enzymmarkierten Antikörpers ist ein Phosphatase-markiertes 30 Ziegen anti-Schaf Immunglobulin, oder ein entsprechender Ziegen anti-Maus Antikörper, die kommerziell bezogen werden können.

Die Menge des gebundenen Antikörperproteins lässt sich anhand einer Enzym-Substrat-Reaktion, z.B. mit Hilfe spektroskopischer Verfahren bestimmen.

Ebenfalls bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist ein ELISA-Test, der auf der Konkurrenz von 35 markiertem sowie von freiem Antigen um den an eines der zuvor genannten Trägermaterialien gebundenen Antikörper beruht.

Der Anteil an freiem Antigen, der in einer bestimmten Probe vorliegt, wird in diesem Fall über die Abnahme an markiertem Antigen bestimmt, die umso präziser ist, je mehr freies Antigen die Probe enthält.

Eine weitere Möglichkeit zur Durchführung des ELISA-Assays umfasst die folgenden Verfahrensmassnahmen:

Einer der zuvor beschriebenen Carrier, der mit einem der erfundungsgemäßen Antikörper beschichtet ist, wird mit einer Testlösung inkubiert, die das nachzuweisende Antigen enthält. Danach wird der gesamte Ansatz mit einem polyklonalen Immunserum gegen besagtes Antigen, beispielsweise einem Immunserum vom Schaf, inkubiert und die gebundenen Antikörper des polyklonalen Serums werden mit Hilfe Enzym-45 markierter Antikörper, die diese erkennen und binden, entwickelt. Die Menge des gebundenen Proteins wird anhand einer Enzym-Substrat Reaktion bestimmt.

Ein Beispiel eines solchen Enzym-markierten Antikörpers ist ein Phosphatase-markiertes Ziegen anti-Schaf Immunglobulin, das kommerziell erhältlich ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Durchführung des ELISA-Assays besteht in der Inkubation eines der zuvor beschriebenen Trägermaterialien, das mit einem der erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper beschichtet ist, mit einer Testlösung sowie einer zweiten Lösung, die einen Enzym-konjugierten monoklonalen Antikörper enthält.

Der freie monoklonale Antikörper erkennt dabei ein anderes Epitop auf dem Antigen als der Enzym-gekoppelte Antikörper. Die Menge des gebundenen Enzyms kann mit Hilfe einer Enzym-Substrat Reaktion bestimmt werden, z.B. in Form einer Farbänderung, die optisch wahrgenommen werden kann.

Die Farbänderung ist dabei proportional der Menge des Antigens in der Testlösung.

Darüberhinaus kann der erfundungsgemäße Antikörper auch in einem ELISA Test verwendet werden, bei dem dieser mit einem Enzym markiert ist und der Carrier mit einem monoklonalen anti-Antigen

Antikörper beschichtet ist, der ein anderes Epitop erkennt als der erfundungsgemäße monoklonale Antikörper.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Mittel für die qualitative und quantitative Bestimmung von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. von Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber von Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, wie z.B. Hydroxyatrazin, Hydroxypropazin, Hydroxysimazin etc., in Form eines Test-Kits, die neben den erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörpern und/oder deren Derivaten, gegebenenfalls auch noch andere monoklonale oder polyklonale Antikörper, insbesondere aber markierte monoklonale oder polyklonale Antikörper; sowie weitere Zusätze enthalten können.

10 Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung sind Test-Kits, die auf einem der üblicherweise verwendeten Immunassays basieren, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Radioimmunassay, Enzym-gekoppelter Immunassay und Chemilumineszenzassay. Ganz besonders bevorzugt sind Test-Kits, bei denen der Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. von Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber von Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, wie z.B. Hydroxyatrazin, Hydroxypropazin, Hydroxysimazin etc. auf einem kompetitiven Immunassay, insbesondere aber auf einem Enzym-gekoppelten Immunassay (ELISA) beruht.

Test-Kits für einen radioimmunologischen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. von Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber von Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, wie z.B. Hydroxyatrazin, Hydroxypropazin, Hydroxysimazin etc., können beispielsweise die folgenden Bestandteile enthalten:

- (a) ein geeignetes Trägermaterial, das unbeschichtet oder aber mit einem der erfundungsgemäßen Antikörper oder einem Antigenkonjugat beschichtet sein kann;
- (b) gegebenenfalls gefriergetrocknete oder konzentrierte Lösungen eines der erfundungsgemäßen Antikörper und/oder eines radioaktiv markierten Derivates davon oder radioaktiv markiertes Antigen oder standardisierte Lösungen des Antigens;
- (c) Pufferlösungen und
- (d) gegebenenfalls Polypeptide, Detergentien und weitere Zusätze, die beispielsweise eine unspezifische Adsorption und Aggregatbildung verhindern sowie
- (e) Pipetten, Reaktionsgefässe, Eichkurven, Beipackzettel etc.

30 Test-Kits für den immunologischen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. von Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber von Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, wie z.B. Hydroxyatrazin, Hydroxypropazin, Hydroxysimazin etc., die auf einem Enzym-gekoppelten Immunassay (ELISA) basieren, können beispielsweise die folgenden Bestandteile enthalten:

- (a) ein geeignetes Trägermaterial, das unbeschichtet oder aber mit einem der erfundungsgemäßen Antikörper oder einem Antigenkonjugat beschichtet sein kann;
- (b) gegebenenfalls gefriergetrocknete oder konzentrierte Lösungen eines der erfundungsgemäßen Antikörper und/oder eines zweiten Enzym-markierten monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, der gegen das zu bestimmende Antigen oder einen das Antigen erkennenden Antikörper gerichtet ist;
- (c) Enzymsubstrate in fester oder gelöster Form;
- (e) das Antigen oder standardisierte Lösungen des Antigens;
- (f) Pufferlösungen;
- (g) gegebenenfalls Polypeptide, Detergentien und weitere Zusätze, die beispielsweise eine unspezifische Adsorption und Aggregatbildung verhindern sowie
- (h) Pipetten, Reaktionsgefässe, Eichkurven, Farbtafeln, Beipackzettel, etc.

Ein Test-Kit für den Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. von Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber von Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, wie z.B. Hydroxyatrazin, Hydroxypropazin, Hydroxysimazin etc., der auf einem Chemilumineszenztest basiert, kann beispielsweise die folgenden Bestandteile enthalten:

- (a) ein geeignetes Trägermaterial, das unbeschichtet oder aber mit einem der erfundungsgemäßen Antikörper oder einem Antigenkonjugat beschichtet sein kann;
- (b) gegebenenfalls gefriergetrocknete oder konzentrierte Lösungen eines der erfundungsgemäßen Antikörper und eines zweiten polyklonalen Antikörpers, der in der Lage ist, den erfundungsgemäßen ersten Antikörper zu erkennen und der mit einem chemilumineszierenden Marker verknüpft ist;
- (c) Lösungen enthaltend eine Komponente, die die Emission von Licht auslöst, wie z.B. H₂O₂ und NaOH;
- (d) Pufferlösungen;
- (e) gegebenenfalls Polypeptide, Detergentien und weitere Zusätze, die eine unspezifische Adsorption

und Aggregatbildung verhindern sowie

(f) Pipetten, Reaktionsgefässe, Beipackzettel, etc.

- Trägermaterialien, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung Verwendung finden können, umfassen in erster Linie unlösliche, polymere Materialien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polystyren, 5 Polyethylen, Polypropylen, Polyester, Polyacrylnitril, Polyvinylchlorid, Polyacrylamid, Nitrocellulose, quervernetztes Dextran, fluorierte Harze, Agarose, quervernetzte Agarose, Polysaccharide, etc. Daneben sind aber auch andere Materialien denkbar, wie z.B. Glas, Metall, Netzgewebe auf Nylonbasis, etc.

- Die zuvor im einzelnen genannten Trägermaterialien können sehr unterschiedlich ausgestaltet sein und in Abhängigkeit vom jeweils angestrebten spezifischen Verwendungszweck sehr verschiedenartige Formen 10 aufweisen. Diese umfassen beispielsweise Schalen, Kugeln, Platten, Stäbchen, Zellen, Fläschchen, Röhrchen, Fasern, Netze, etc.

- Häufige Verwendung bei der Herstellung von Test-Kits finden beispielsweise Mikrotiterplatten aus durchsichtigen Plastikmaterialien, wie z.B. Polyvinylchlorid oder Polystyren, die unbeschichtet oder aber mit einem der erfindungsgemäßen Antikörper, mit freiem Antigen oder einem Antigenkonjugat beschichtet sein 15 können. Ebenso verwendet werden Kügelchen, Röhrchen oder Stäbchen aus Polystyren sowie Polystyrenlatex, wobei das umgebende Latexmaterial via Zentrifugation von den Polystyrenpartikeln abgetrennt werden kann.

- Einen weiteren Bestandteil des erfindungsgemäßen Testkits bilden Marker oder Indikatoren, mit deren Hilfe es möglich ist, das Vorliegen einer Komplexbildungsreaktion, insbesondere aber einer Immunreaktion 20 nachzuweisen, die vorzugsweise zu einem Antigen-Antikörper-Komplex oder aber zu einem Ligand-Rezeptor-Komplex führt, wobei neben qualitativen gegebenenfalls auch quantitative Aussagen über das nachzuweisende Antigen möglich sind. Als Marker oder Indikatoren kommen sowohl einzelne Atome als auch Moleküle in Betracht, die entweder direkt oder aber indirekt an der Erzeugung eines nachweisbaren 25 Signals beteiligt sein können. Diese Marker oder Indikatoren können entweder direkt mit dem nachzuweisenden Antigen oder mit einem der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper verknüpft sein oder aber in diese eingebaut vorliegen. Sie können aber auch als Einzelsubstanzen oder als Bestandteil einer separaten Verbindung vorliegen, die weder das nachzuweisende Antigen selbst noch einer der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper ist, die ihrerseits aber in der Lage ist mit dem Rezeptormolekül zu reagieren, z.B. in Form einer Komplexbildung.

- 30 Bei diesen separat vorliegenden Verbindungen handelt es sich vorzugsweise um ein zweites Antikörpermolekül, das sowohl monoklonalen als auch polyklonalen Ursprungs sein kann, um ein Komplementprotein oder Fragmente davon, um *S. aureus* protein A, etc. Diese separaten Verbindungen erkennen und binden spezifisch an ein Rezeptormolekül, wie z.B. das nachzuweisende Antigen oder einen der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, vorzugsweise aber an ein Rezeptormolekül, das in Form eines 35 Komplexes vorliegt.

In vielen Fällen sind weitere, zusätzliche Reagenzien notwendig, die dann erst im Zusammenwirken mit dem Marker zu einem nachweisbaren Signal führen. Dies gilt insbesondere dann, wenn Enzyme involviert sind.

- Marker oder Indikatoren, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind 40 dem Fachmann auf dem Gebiet der Immunologie und Immunchemie bestens bekannt. Sie umfassen beispielsweise radioaktiv markierte Elemente oder Substanzen, Enzyme oder chemilumineszierende Substanzen. Die folgende Aufzählung möglicher Marker oder Indikatoren soll lediglich dazu dienen, die grosse Vielfalt der verwendbaren Substanzen und Reagenzien beispielhaft zu veranschaulichen, ohne dadurch jedoch den Erfindungsgegenstand in irgendeiner Weise einzuschränken.

- 45 Geeignete Marker oder Indikatoren sind beispielsweise innerhalb der Gruppe der radioaktiven Elemente zu finden. Dabei sind insbesondere solche Elemente bevorzugt, die entweder selbst γ -Strahlen emittieren, wie z.B. ^{124}J , ^{125}J , ^{128}J , ^{132}J , ^{51}Cr oder aber eine Emittierung dieser Strahlen induzieren, wie z.B. ^{11}C , ^{18}F , ^{13}N . Ebenfalls geeignet sind sog. β -Stahler wie ^{111}In , ^{14}C und ^{3}H .

- Weitere geeignete Marker umfassen chemilumineszierende Substanzen, insbesondere aber fluoreszierende 50 Substanzen, die sehr einfach auf chemischem Wege mit dem Antigen oder einem Antikörper verbunden werden können ohne diesen zu denaturieren. Das entstehende Fluorochrom lässt sich sehr einfach mit Hilfe fluorometrischer Verfahren nachweisen. Im einzelnen zu nennen sind an dieser Stelle Fluorochrome ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Fluoresceiniscocyanat, Fluoresceinisothiocyanat, 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid, Tetramethylrhodaminisothiocyanat, Lissamin, Rhodamin 8200 55 Sulfonylchlorid, etc.

Weitere fluoreszierende Agentien sowie eine Beschreibung von Analysetechniken findet sich bei DeLuca, "Immunofluorescence Analysis", in: Antibody As a Tool, Marchalonis et al, John Wiley & Sons, Ltd., pp 189-231 (1982).

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung von Enzymen als Marker- oder Indikatorsubstanzen, wie z.B. Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase, β -D-Galaktosidase, Glucose-oxidase, Glucoamylase, Carbonsäureanhydrase, Acetylcholinesterase, Lysozym, Malatdehydrogenase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase, etc. Bei der Verwendung von Enzymen als Markersubstanzen ist es 5 notwendig zusätzliche Reagentien zuzugeben, die es erlauben, die Bildung eines Immunkomplexes über die Enzymaktivität zu verfolgen sowie gegebenenfalls ein Stop-Reagenz, mit welchem die Enzymreaktion beendet werden kann.

Besonders bevorzugt sind dabei Reagentien, die zu einer Farbreaktion führen. Im Falle der Meerrettich-peroxidase sei an dieser Stelle beispielhaft Hydrogenperoxid genannt, das in Kombination mit einem 10 zusätzlich oxidierten Farbstoffprecursor wie z.B. Diaminobenzidin oder o-Phenyldiamin, zu einer Braun bzw. Gelbfärbung führt. Bei Verwendung der Glucoseoxidase als Markersubstanz kann beispielsweise 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure) [ABTS] als Substrat eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft somit die Verwendung von Test-Kits, die 15 zumindest einen der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper als Reagenz enthalten, zum schnellen und effektiven, qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten bzw. von Abbauprodukten von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, insbesondere aber von Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, wie z.B. Hydroxyatrazin, Hydroxypropazin, Hydroxysimazin etc. sowie zur Differenzierung von Atrazin und/oder Atrazinderivaten gegenüber ihren Abbauprodukten.

20

I. Nichtlimitierende Ausführungsbeispiele

25

Beispiel 1: Synthese von Atrazin/Hydroxyatrazinkonjugaten

1.1: Triazinyl-Valeriansäure-Kupplungskomponenten

30

a) 2-chlor-4-isopropylamino-6-(1-carboxybutyl-4-amino)-s-triazin

Zu einer Mischung von 10,35 g 2,6-Dichlor-4-isopropylamino-s-triazin und 6,15 g 5-Aminovaleriansäure in 150 ml trockenen Chloroforms werden 15,66 ml Diazobicyclo[5.4.0]undec-5-en gegeben, 1 Stunde bei Rückflusstemperatur gerührt und die Reaktionslösung am Vakuum eingedampft (Zimmertemperatur). Der ölige Rückstand wird bei 0 °C mit 60 ml 2N Salzsäure verrührt, nach zwei-stündigem Stehen der Niederschlag filtriert, mit Wasser und Diäthyläther gewaschen und getrocknet. Man erhält 4,3 g des gewünschten Produktes, 2-Chlor-4-isopropylamino-6-(1-carboxybutyl-4-amino)-s-triazin (Smp. 191-192 °C).

40

b) 2-Hydroxy-4-isopropylamino-6-(1-carboxybutyl-4-amino)-s-triazin • Hydrochlorid

1 g 2-chlor-4-isopropylamino-6-(1-carboxybutyl-4-amino)-s-triazin wird während 4 Stunden bei Raumtemperatur in 7 ml 6 N Salzsäure gerührt, am Vakuum bei 45 °C eingeengt, die Kristalle filtriert und getrocknet. Man erhält 0,98 g des gewünschten Produktes, 2-Hydroxy-4-isopropylamino-6-(1-carboxybutyl-4-amino)-s-triazin • Hydrochlorid (Smp. 149-151 °C).

1.2: Triazin-Protein-Konjugate

50

Die Atrazin- und Hydroxyatrazinderivate werden entweder an "Bovine Serum Albumine" (BSA; Fluka) oder an "Keyhole Limpet Hemocyanin" (KLH; Calbiochem) konjugiert unter Anwendung der aktivierten Ester-Methode (Kulkarni et al., 1981).

Im einzelnen wird dabei die Carboxylgruppe des Derivats in N,N-Dimethylformamid (DMF) (6 mg/200 μ l) bei Raumtemperatur solubilisiert und anschliessend mit einem 4molaren Überschuss von α -Hydroxysuccinimid (9,1 mg/200 μ l) sowie N,N'-Dicyclohexylcarbodilimid (16 mg/200 μ l) versetzt.

Das bei der Reaktion gebildete Präzipitat wird durch 3 minütige Zentrifugation mit 12'000 g bei Raumtemperatur entfernt und der aktivierte Ester anschliessend zu BSA oder KLH gegeben, das zuvor in einer Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS-Puffer) solubilisiert worden ist. Das molare Verhältnis von

[Derivat]/[BSA] beträgt dabei ca. 55/1 (24 mg Derivat/5.4 ml BSA).

Nach 4stündiger Inkubation bei einer Temperatur von 4°C wird das gebildete Präzipitat durch 10 minütige Zentrifugation mit 2'000 g bei 4°C entfernt und der verbleibende Ueberstand ausgiebig gegen PBS dialysiert, bevor er dann für die Immunisierungs-Experimente verwendet wird.

Das Ausmass der Kupplungsreaktion wird mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese sowie durch Absorptionsspektrophotometrie bestimmt. Das molare Verhältnis von Hydroxyatrazin bzw. Atrazin zu BSA liegt bei ca. 11:1.

10 Beispiel 2: Immunisierung

Gruppen von jeweils 5 weiblichen BALB/c Mäusen (Tierfarm Sisseln, Schweiz), die zwischen 4 und 6 Wochen alt sind, erhalten 3 Serien von intraperitonealen bzw. subkutanen Injektionen mit KLH-konjugiertem Atrazin oder Hydroxyatrazin (50 µg/Injektion).

Die erste Injektion beinhaltet 0,1 ml des Konjugates in PBS, das in einem Verhältnis von 1:1 mit 0,1 ml komplettem Freund Adjuvanz vermischt ist. 50 µl dieser Injektionslösung werden intraperitoneal injiziert, die restlichen 150 µl subcutan.

Bei der zweiten und dritten Injektionsserie, die 14 bzw. 30 Tage nach der Erstapplikation erfolgt, wird das komplette Freund Adjuvans durch inkomplettes ersetzt.

1 Woche nach der letzten Injektion wird Blutserum von den Versuchstieren entnommen und die Bluttiter mit Hilfe eines ELISA-Tests bestimmt, wobei die Mikrotiterplatten zuvor mit BSA-konjugiertem Hapten beschichtet werden (siehe Abschnitt 6).

Nach einer Ruheperiode von 2 Monaten erfolgt eine weitere einmalige intraperitoneale Injektion des KLH-Konjugates in einer Dosierung von 500 µg/200 µl PBS.

25

Beispiel 3: Fusionsprotokoll

30 3.1. Gewinnung von "Feeder"-Zellen (peritoneale Makrophagen).

Unbehandelte, ca. 6 bis 8 Wochen alte Balb/c-Mäuse werden einen Tag vor der beabsichtigten Fusion getötet und durch Eintauchen in 70 %igem Alkohol sterilisiert.

Anschliessend wird das Fell und die obere Bauchhaut steril angeschnitten ohne das Peritoneum zu verletzen. Mit einer sterilen 5 ml Plastikspritze und einer sterilen 18'er Injektionsnadel werden 4 ml BSS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) und 1 ml Luft in die Bauchhöhle injiziert.

Nach leichtem Massieren des Bauches (wobei Spritze und Nadel in der Bauchhöhle verbleiben) wird der zuvor injizierte BSS-Puffer wieder aus dem Peritoneum abgezogen und in ein steriles Falconrörchen gegeben. Dieses Procedere wird noch 2 mal wiederholt. Die so gewonnenen Makrophagen werden mit Eis gekühlt und anschliessend 2 x mit je 20 ml BSS gewaschen.

Die Makrophagen werden dabei je 10 Min. bei 300 g und einer Temperatur von 5°C zentrifugiert. Das Pellet wird dann in 50 ml HAT-Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf 4 Costarplatten mit insgesamt 24 Vertiefungen verteilt (0,5 ml/Vertiefung).

Anschliessend werden die so vorbereiteten Makrophagen bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 6 % in einem Inkubator aufbewahrt.

Pro Fusionsvorgang werden ca. 4 x 10⁶ Makrophagen benötigt.

3.2. Anzucht der Myeloma-Zelllinie Sp 2/0-Ag 14

Bei der genannten Myeloma-Zelllinie Sp 2/0-Ag 14 handelt es sich um eine Myeloma-Zelllinie, die selbst keine Antikörper sezerniert und die bei M. Shulman et al. (1978) beschrieben ist. Diese Myeloma-Zelllinie kann bei der "American Type Culture Collection" in Rockville, Maryland bezogen werden.

Pro Fusion benötigt man 50 ml einer gut gewachsenen Kultur, die mindestens 10 Millionen Zellen enthält. Die Kultivierung der Myelomzellen erfolgt vorzugsweise in T 175 "Falcon"-Flaschen (Fa. Beckton & Dickenson).

Einen Tag vor der Fusion wird das Kultivierungsmedium (RPMI 1640) durch frisches RPMI 1640-Medium ersetzt. Am Tag der Fusion werden die Sp 2/0-Ag 14 Zellen geerntet, in ein steriles 50 ml

Plastikrörchen gegeben und 10 Min. bei 300 g und einer Temperatur von 5 °C zentrifugiert (MSE Zentrifuge, Modell Chilspin, UK).

Nach der Zentrifugation wird der Ueberstand abgezogen und verworfen. Die Zellen werden 2 x mit je ca. 30 ml BSS-Puffer (Ca^{2+} und Mg^{2+} frei) gewaschen (10 Min. bei 300 g, 5 °C) und anschliessend in 5 ml BSS resuspendiert.

Ein Aliquot der Zellsuspension wird zur Bestimmung der Zellzahl entnommen und mit Fluoresceindiacetat (FDA) gefärbt. Bis zur Weiterverwendung werden die Myelomzellen auf Eis aufbewahrt.

10 3.3. Herstellung einer Milzzellsuspension

Die Entnahme der Milz aus einer zuvor gemäss Beispiel 2 immunisierten Balb/c-Maus erfolgt unter sterilen Bedingungen und unter Kühlung mit Eis.

Die zuvor immunisierte Balb/c-Maus wird durch Genickbruch getötet und die Milz steril entnommen. Dazu wird die Maus kurz in 70 %igen Ethanol eingetaucht und mit sterilem Besteck präpariert. Die Milz wird vorsichtig entnommen und auf ein feines Nylonnetz gelegt. Dort wird sie mit einer Schere fein zerschnitten und dann mit Hilfe eines 5 ml Spritzenstempels vorsichtig durch das Netz gedrückt, ohne dabei zu viele Zellen zu zerstören. Während des ganzen Vorgangs wird das Netz mit BSS gespült.

Die so gewonnene Zellsuspension wird in 50 ml Plastikrörchen gegeben und 10 Min. bei 300 g und einer Temperatur von 5 °C zentrifugiert (MSE Zentrifuge, Modell Chilspin; UK). Die Zellen werden anschliessend 2 x mit je 20 ml BSS gewaschen (10 Min.; 300 g; 5 °C; MES Chilspin) und das Zellpellet wird nach der Zentrifugation in 10 ml BSS resuspendiert.

Bis zur Fusion mit Sp 2/0-Ag14 Myelomzellen werden die Milzzellen auf Eis belassen.

25

3.4. Fusion: Milzzellen und Sp 2/0-Ag 14 Myelomzellen

Das Verhältnis von Myelomzellen zu Milzzellen sollte für die Fusion 1:10 betragen.

Milzzellen (in BSS-Puffer) und Sp 2/0-Ag14 Myelomzellen (in BSS-Puffer) werden in dem angegebenen Verhältnis zusammengegeben und 10 Min. bei 300 g und einer Temperatur von 5 °C zentrifugiert (MSE Zentrifuge, Modell Chilspin). Das Pellet wird nochmals in BSS-Puffer resuspendiert und die Suspension anschliessend erneut zentrifugiert.

Das Pellet wird vorsichtig aufgerührt und in 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Es wird dann 1 ml vorgewärmtes und steriles PEG-4000 (MERCK) über einen Zeitraum von 60 Sek. tropfenweise zu den Zellen zugegeben, wobei der gesamte Ansatz ständig bewegt wird. Die Zellen werden anschliessend noch 30 Sek. lang weitergeschüttelt, bevor 5 ml einer zuvor erwärmmten BSS-Puffers (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}) ebenfalls tropfenweise über einen Zeitraum von ca. 5 Min. unter ständigem Rühren dazugegeben werden.

Die auf die beschriebene Weise fusionierten Zellen werden dann abzentrifugiert (10 Min.; 300 g; 20 °C, MSE Zentrifuge, Modell Chilspin), der Ueberstand wird abgezogen und verworfen. Das Zellpellet wird in 50 ml HAT-Medium resuspendiert und die so erhaltene Zellsuspension auf die vorbereiteten 4 Costarplatten (Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen, Durchmesser pro Vertiefung 24 mm; Gesamtfläche für Zellwachstum 2,0 cm²) verteilt (0,5 ml/Vertiefung).

Die Inkubation der Costarplatten erfolgt bei einer Temperatur von 37 °C und bei einer CO₂-Konzentration von 6 %.

45

Beispiel 4: Kultivierung der Hybridzellen

Am 1. Tag nach der Zellfusion wird 1 ml HAT-Medium pro Vertiefung zu den Kulturplatten zugegeben. 50 bis 4 Tage nach der Zellfusion erfolgt eine mikroskopische Kontrolle der fusionierten Zellen. Gleichzeitig wird das verbrauchte Medium abgesaugt und durch 1 ml frisches HAT-Medium ersetzt. Nach weiteren 3 Tagen (6 - 7 Tage nach der Zellfusion) erfolgt ein erneuter Wechsel des Kulturmediums. Ab dem 7. bis 10 Tag nach der Zellfusion wird jede Vertiefung mikroskopisch nach Hybriden abgesucht und 2 bis 3x wöchentlich das Medium erneuert.

Sobald in einer Vertiefung Hybride gewachsen sind, kann das HAT Medium dort durch HT-Medium ersetzt werden. Der Ueberstand von gewaschenen Hybridkulturen (mindestens 10 % der Vertiefung) wird mit einer sterilen Pasteurpipette abgehoben und auf das Vorhandensein von Antikörpern getestet.

Sobald die Vertiefung mit positiven Hybridkolonien voll bewachsen sind, können diese auf neue

Costarplatten in RPMI 1640-Medium transferiert werden, wobei der Inhalt einer vollbewachsenen Vertiefung auf 2 bis 3 neue Vertiefungen verteilt wird.

5 Beispiel 5: Klonierung der positiven Hybridzellen

- Die Zellen einer positiven Vertiefung werden mit Hilfe einer Pipette gelöst und in 1 ml Medium in ein Röhrchen überführt. Anschliessend wird ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl entnommen und mit FDA angefärbt (Verdünnung 1 : 2 mit FDA: 50 µl Zellen + 50 µl Farbstoff). Die bevorzugte Zellzahl liegt bei 10^5 bis 10^6 Zellen/ml.
- 10 Anschliessend werden die Hybridzellen in einem Verhältnis von 1 : 100 mit HT-Medium verdünnt (z.B. 100 µl Zellen + 9,9 ml HT-Medium).
- In zwei 50 ml Falconröhren werden je 25 ml HT-Medium vorgelegt und mit 5 ml einer Macrophagen-suspension auf insgesamt 30 ml pro Röhrchen aufgefüllt. Die Macrophagen werden zuvor aus einer Maus
- 15 isoliert und in 10 ml HT-Medium resuspendiert (vgl. Abschnitt 3.1).
- In diesen die Macrophagen enthaltenden Falcon-Röhrchen werden die Hybridzellen verdünnt, bis eine Zelldichte von (i) 270 Zellen/30 ml bzw. (ii) 90 Zellen/30 ml erreicht ist. Anschliessend werden diese Ansätze auf Costarplatten (Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen) verteilt, wobei je 200 µl pro Vertiefung zugegeben werden. Dies entspricht einer Zellzahl von (i) 1,8 Zellen/Vertiefung bzw. (ii) 0,6 Zellen/Vertiefung.
- 20 Pro Verdünnung benötigt man auf diese Weise 1,5 Mikrotiterplatten.
- Nach 7 Tagen werden die einzelnen Vertiefungen mikroskopisch kontrolliert und die Vertiefungen die Zellklone enthalten erfasst. Diejenige Verdünnung, bei der ca. 50 % der Vertiefungen Zellklone enthalten wird für den ELISA-Test verwendet. Dies sollte in der Regel die Verdünnung mit 0,6 Zellen/Vertiefung sein.
- Nach ca. 7 - 10 Tagen werden die Ueberstände der positiven Vertiefungen (mit Klonen) in einem
- 25 ELISA-Test auf die Anwesenheit von monoklonalen Antikörpern getestet und die positiven Klone auf Costarplatten (mit 24 Bohrungen) in RPMI 1640-Medium vermehrt. Aliquots dieser positiven Klone werden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

30 Beispiel 6: Hybridoma-Screening (ELISA-Test)

- Zunächst werden 100 µl einer Lösung von BSA-konjugiertem Hapten in Natriumcarbonat-Puffer (50 mM, pH 9.6) in die einzelnen Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und dieser Ansatz bei 4 °C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Anschliessend werden die Vertiefungen jeweils 5 x mit einem 0,1 % PBS-Tween Puffer gewaschen.
- 35 Zur Blockierung der unbesetzten Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte werden 200 µl einer PBS-BSA Lösung (1 %) in jede Vertiefung gegeben. Dieser Ansatz wird 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend mit einem 0,1 %igen PBS-Tween-Puffer gewaschen.
- Man gibt dann zu jeder Vertiefung 200 µl des Hybridoma-Ueberstands, der im Verhältnis 1:2 mit PBS-
- 40 Tween (0,1 %) verdünnt ist, hinzu und inkubiert den gesamten Ansatz für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschliessend werden die Vertiefungen erneut 5 x mit einem 0,1 %igen PBS-Tween-Puffer gewaschen.
- 45 Es folgt die Inkubation mit Phosphatase-konjugiertem anti-Maus Antikörper (Kirkegaard & Perry Lab.). Zunächst werden 100 µl eines über eine Affinitätschromatographie gereinigten Ziegen Antikörpers gegen Mäuse IgG, der 1 : 1500 in PBS-Tween (0,1 %) verdünnt vorliegt (Kirkegaard & Perry Laboratories) und mit alkalischer Phosphatase markiert ist, zu jeder Vertiefung hinzugegeben.
- Die Inkubationszeit beträgt 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Anschliessend werden die einzelnen Vertiefungen erneut mit PBS-Tween (0,1 %) gewaschen (5 x).
- Danach werden 150 µl einer substrathaltigen Lösung (1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat) in jede Vertiefung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden im Dunkeln erfolgt die spektroskopische
- 50 Bestimmung bei 405 nm. Positive Hybridoma-Zellen, die einen spezifischen Antikörper sezernieren geben ein starkes positives Signal bei der gewählten Wellenlänge.

Beispiel 7: Expansion der Hybridomazellen in der Maus

- 55 Für die Anregung der Ascites-Produktion werden weibliche Balb/c Mäuse (20 - 25 mg) (Tierfarm Sisseln, CH) mit 0,3 ml Pristan Oel (Aldrich Chemical) vorbehandelt, das intraperitoneal injiziert wird. 1 bis 3 Wochen nach der Pristan Applikation erhalten die Mäuse eine zweite Injektion (0,2 ml Pristan-

Oel, i.p.). Gleichzeitig mit dieser 2. Injektion erhalten die Tiere 2×10^6 Hybridomazellen in 0,2 ml PBS.

Die aus dieser Behandlung resultierende Ascitesflüssigkeit wird gesammelt, bei 800 g zentrifugiert und bei einer Temperatur von -20 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wird die Ascitesflüssigkeit 1 Stunde bei 30'000 g zentrifugiert. Die oberste Schicht, die vorwiegend Lipide enthält, wird entfernt. Anschliessend wird die Proteinkonzentration bestimmt und auf einen Wert von 10 mg/ml eingestellt durch Zugabe von PBS.

Die Immunglobulin G Fraktion (IgG) wird durch tropfenweise Zugabe von 0,9 Volumeneinheiten einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bei 0 °C präzipitiert. Nach 1 Stunde wird die IgG-Fraktion pelletiert durch einstündige Zentrifugation bei 22'000 g. Das Pellet wird anschliessend in 20 mM-Tris-HCl Puffer, pH 7,9, der 50 mM NaCl enthält, aufgelöst und gegen den gleichen Puffer über Nacht bei 4 °C dialysiert.

Die weitere Aufarbeitung der IgG Fraktion geschieht mit Hilfe einer Anionen-Austauschchromatographie an einer DE-52 Diethylaminoethylcellulose (Whatman) Säule. Die Probe wird 1:2 (v/v) mit 20 mM Tris-HCl, pH 7,9 verdünnt, bis eine NaCl Endkonzentration von 25 mM erreicht ist und 10 mg Protein/ml Gel werden auf die Säule aufgetragen. Die Elution wird erreicht durch Erhöhung der NaCl-Konzentration von 25 mM auf 200 mM (linearer Gradient). Im allgemeinen erfolgt die Elution monoklonaler Antikörper im Bereich von 80 mM NaCl.

Die Fraktionen werden über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C gegen PBS dialysiert und bei -70 °C aufbewahrt. Der Reinheitsgrad wird mit Hilfe einer Natriumdodecylsulphat Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt, sowie durch isoelektrische Fokussierung.

Im vorliegenden Fall liegt der Reinheitsgrad bei >90 %.

20

Beispiel 8: Atrazin und Hydroxyatrazin-Nachweis

Der Nachweis von Atrazin und Hydroxyatrazin erfolgt mit Hilfe eines zweistufigen, kompetitiven ELISA-

25 Tests.

BSA-konjugiertes Hapten wird zunächst in einem Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6) (0,2 µg/Vertiefung) an Mikrotiterplatten adsorbiert und über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert. Die restlichen freien Bindungsstellen des festen Trägermaterials werden dann durch Zugabe von BSA in Form einer 1 % Lösung blockiert.

30 Die Platten werden anschliessend mit PBS gewaschen, das mit 0,1 % (v/v) Polysorbat 20 angereichert ist (PBS-Tween).

50 µl der zuvor gereinigten monoklonalen Antikörper (2 µg/ml) oder aber des Überstandes der Zellklone (in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:22,5) werden a) mit 950 µl einer Standardlösung, die einen steigenden Anteil an Triazin bzw. Triazin-Analogen enthält, b) mit triazinhaltigen Wasserproben oder c) triazinhaltigen Bodenextrakten inkubiert. (Alle Verdünnungen werden in PBS-Tween vorgenommen).

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur werden 200 µl des Gemisches zu jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte zugegeben und der gesamte Ansatz wird für eine weitere Stunde inkubiert.

Die Vertiefungen werden anschliessend 5 x gewaschen und mit 100 µl/Vertiefung Ziegen-anti-Maus IgG Antikörper der konjugiert an alkalische Phosphatase vorliegt (Verdünnung 1:1500) beschickt und für einen Zeitraum von 1,5 Stunden inkubiert.

Nach erneutem Waschen werden 150 µl/Vertiefung des in 1 mg/ml Diethanolaminpuffer (1 mM, pH 9,8) gelösten Substrates p-Nitrophenylphosphat zu den Vertiefungen zugegeben.

Ein Farbumschlag, der proportional ist zur Menge an Antikörper, der mit dem an die Festphase gebundenen Antigen reagiert hat, wird bei einer Wellenlänge von 405 nm aufgezeichnet. Die Verdünnungen der einzelnen Proben werden so gewählt, dass man ohne Zugabe eines Inhibitors (Bo) Absorptionswerte in einem Bereich zwischen 0,3 und 0,5 erhält. Für die Kontrollen (ohne Antikörper und mit nicht nachweisbaren Mengen an Antigen) ergeben sich Werte von $R \leq 0,005$. Alle Proben werden in dreifacher Ausfertigung bestimmt.

Zur Ermittlung der in einer Probe enthaltenen Menge an Atrazin/Hydroxyatrazin wird zunächst eine Eichkurve erstellt (Abb. 1), wobei $B/Bo \times 100$ gegen die Konzentration an Inhibitor aufgetragen wird. (Bo bedeutet Absorptionsfähigkeit gemessen ohne Zugabe eines Triazininhibitors zum Antikörper, und B Absorptionsfähigkeit bei Zugabe verschieden konzentrierter Triazin-Inhibitoren) Der I_{50} -Wert gibt diejenige Konzentration des Antigens an, bei der die Antikörperbindung an die Festphase zu 50 % gehemmt wird.

Der I_{50} -Wert wird mit Hilfe eines auf die vorliegenden Verhältnisse speziell angepassten ENZFITTER (Leatherbarrow, Elsevier-Biosoft) Kurvenkalkulationsprogramms bestimmt, basierend auf einer 4 Parameter umfassenden logistischen Kurve (Raab GM, 1983). Auch die quantitative Atrazin bzw. Hydroxyatrazinbestimmung in Boden-oder Wasserproben im Rahmen des ELISA wird mit Hilfe des ENZFITTER-Programms durchgeführt, wobei die Anpassung der Kurve auf Standards basiert, die auf jeder Mikrotiterplatte mitlaufen.

Beispiel 8.1: Analyse von Bodenproben

Aliquots (2 g) standardisierter Bodenproben unterschiedlicher Herkunft (siehe Tabelle II) werden in einem Extraktor 4 Stunden mit 20 ml eines Methanol/Wasser [80/20 (v/v)] Gemisches extrahiert. Für den kompetitiven ELISA werden die Bodenextrakte gewöhnlich in einem Verhältnis von 1:40 in PBS-Tween (0.1 %) verdünnt, um einer möglichen Denaturierung der monoklonalen Antikörper durch das Methanol vorzubeugen. Anschliessend werden die verdünnten Bodenproben (950 µl) auf die zuvor beschriebene Weise mit den spezifischen Antikörpern (50 µl)-inkubiert.

Für die HPLC Bestimmung von Hydroxyatrazin werden die Methanolextrakte durch Kationenaustauschchromatographie (z.B. über eine Dowex 50W-X4 Säule, gefolgt von einer Adsorption an ein Amberlite XAD-2 Polystyrendivinylbenzol Austauscherharz) weiter gereinigt. Abschliessend wird eine Gelfiltration, z.B. über eine Bio-Gel P-2 Säule, durchgeführt. Die Proben werden dann auf die HPLC gegeben und Hydroxyatrazin wird bei einer Wellenlänge von 240 nm bestimmt.

Die vergleichende Atrazinbestimmung wird mit Hilfe der Gaschromatographie, unter Verwendung eines thermo-ionischen Detektors, und/oder anschliessender Massenspektroskopie durchgeführt.

Beispiel 8.2: Analyse von Wasserproben

Für den kompetitiven ELISA werden 100 µl eines 10fach konzentrierten PBS-Tween Puffers zu 850 µl einer Wasserprobe zugegeben. Dieser Ansatz wird schliesslich mit 50 µl des anti-Atrazin Antikörpers MAb 4063-21-1 inkubiert.

Für die HPLC Bestimmung werden die in der Wasserprobe (20 ml) enthaltenen s-Triazine zunächst auf einer RP-18 Vorlaufsäule konzentriert und anschliessend auf einer analytischen RP-18 Säule weiter aufgetrennt. Die Atrazinbestimmung wird bei 230 nm durchgeführt.

II. Ergebnisse30 a) Herstellung monoklonaler Antikörper

Bereits wenige Tage nach der erfolgten Zellfusion zwischen Myelomazellen und den Milzzellen einer Maus, die zuvor mit dem in Abschnitt 1 beschriebenen Hydroxykonjugat immunisiert wurde, lassen sich in 35 93 der insgesamt 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatten proliferierende Zellkolonien nachweisen. Dies entspricht einer Fusionseffizienz von 97 %.

10 dieser Zellkolonien produzieren monoklonale Antikörper, welche im ELISA-Test eine sehr starke Reaktion zeigen. Diese werden mit Hilfe der limitierten Verdünnungsmethode (vgl. Abschnitt 5) kloniert.

9 der synthetisierten monoklonalen Antikörper gehören in die IgG1 Subklasse, einer in die IgG2b 40 Subklasse.

Die auf die zuvor beschriebene Weise gewonnenen monoklonalen Antikörper können aufgrund ihrer Kreuzreakтивität, die in einem ELISA-Test bestimmt wird, in 2 Gruppen unterteilt werden.

In der ersten Gruppe (vertreten durch MAb 4009-85-3) ist die Kreuzreakтивität in der Hauptsache auf Hydroxypropazin beschränkt, wohingegen in der zweiten Gruppe (vertreten durch MAb 4009-77-20) Kreuzreaktivitäten auch mit anderen s-Triazinen auftreten, wie z.B. Hydroxysimazin, Hydroxydesmetyn u.a. (vgl. Tabelle 1).

In beiden Gruppen tritt dagegen keine Kreuzreaktivität mit aktiven Triazinen, wie z.B. Atrazin, auf. Somit bleibt die Bindung der monoklonalen Antikörper auf Verbindungen beschränkt, die eine Hydroxy-Gruppe in Position 2 des Triazinringes aufweisen.

50 Die untere Nachweisgrenze für Hydroxyatrazin liegt im Bereich von 0,1 ng/ml Puffer für MAb 4009-85-3 bzw. von 0,05 ng/ml Puffer für MAb 4009-77-20. Die entsprechenden I_{50} -Werte betragen 0,95 ng/ml und 0,5 ng/ml.

Bei Verwendung von Atrazin-Konjugaten (vertreten durch MAb 4063-21-1) erhält man insgesamt 5 monoklonale Antikörper, die alle ein etwa vergleichbares Ausmass an Kreuzreaktivität zeigen. In diesem Fall findet man eine Kreuzreaktivität mit verschiedenen aktiven s-Triazinen.

Die auftretenden Kreuzreaktivitäten mit hydroxylierten Metaboliten sind dagegen vernachlässigbar gering. (vgl. Tabelle 1)

Für MAb 4063-21-1 liegt die Nachweisgrenze für Atrazin bei 0,05 ng/ml Puffer bei einem I_{50} -Wert (50

% Hemmung) von 0.45 ng/ml.

b) Rückgewinnungsstudien

5

Diese Rückgewinnungsstudien werden durchgeführt, indem man eine bekannte Menge an Hydroxyatrazin oder Atrazin zu einem Methanol/Wasser Bodenextrakt zugibt. Sie dienen in erster Linie dazu, die eventuell störenden Einflüsse von organischem Material während des Immunassays zu untersuchen.

10 Tab. II zeigt, dass eine fast komplett Rückgewinnung erfolgt, unabhängig von der Zusammensetzung der verwendeten Bodenproben. Sogar bei einem Humusanteil von annähernd 10 % beträgt die Rückgewinnungsrate 97%.

c) Atrazinnachweis in Wasserproben

15

21 verschiedene Wasserproben wurden mit Hilfe von HPLC und ELISA unter Verwendung von MAbs 4063-21-1 analysiert.

Für die HPLC-Bestimmung muss ein Aufkonzentrierungsschritt durchgeführt werden, der bei Verwendung der erfundungsgemäßen monokonalen Antikörper in einem ELISA-Assay entfällt.

20

Tab. III zeigt, dass die Nachweissgrenze für Atrazin bei Verwendung des Immunassays bei ca. 0.05 ppb liegt. Für die Atrazin-haltigen Proben (> 0.05 ppb) wird die Korrelation zwischen ELISA und HPLC-Bestimmung mittels Regressionsanalyse bestimmt. Dabei wird eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden sichtbar ($r = 0.91$, $p < 0,0005$), wobei die leicht erhöhten Werte bei der ELISA-Bestimmung nicht signifikant sind.

25

Die Wasserproben wurden darüberhinaus auch auf Spuren von Hydroxyatrazin hin untersucht. Mit keiner der beiden Methoden (HPLC und ELISA) liess sich dieser Metabolit nachweisen.

Hinterlegung:

30

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung hergestellten und verwendeten Hybridoma-Zelllinien wurden bei der als Internationale Hinterlegungsstelle anerkannten 'European Collection of Animal Cell Cultures' (ECACC) in Salisbury, UK, entsprechend den Anforderungen des Budapest Vertrages für die Internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung, hinterlegt. Eine Erklärung zur Lebensfähigkeit der hinterlegten Proben wird durch die besagte Internationale Hinterlegungsstelle ausgefertigt.

40

Zelllinie	Hinterlegungsdatum	Hinterlegungsnummer*	Datum der Lebensfähigkeitsbescheinigung
Hybridoma Klon 4063-21-1	25.08.1988	8808/2501	25.08.1988
Hybridoma Klon 4009-77-20	25.08.1988	8808/2502	25.08.1988
Hybridoma Klon 4009-85-3	25.08.1988	8808/2503	25.08.1988

45

* Hinterlegungsnummer, ausgegeben durch die oben bezeichnete Internationale Hinterlegungsstelle.

50

55

Verwendete Medien und Puffer	
A) RPMI 1640-Medium	
RPMI 1640 (Seromed) mit folgenden Zusätzen:	
Kälberserum	15 %
L-Glutamin	4 mM
Gentamycin	0,01 %
Natrium-Pyruvat	1 mM
2-Mercaptoethanol	50 µM
Insulin	5 µM
Transferrin	5 µM
Selen (ITS)	5 µM

5

10

15

20 **B) HAT-Medium**

1 Liter RPMI 1640 Medium mit 20 ml Zusatz von HAT conc. 50 x von Boehringer (Hypoxanthin 680,5 mg/l; Aminopterin 8,8 mg/l; Thymidin 193,8 mg/l)

25 **C) HT-Medium**

1 Liter RPMI-1640 Medium mit 20 ml Zusatz von HT conc. 50 x von Boehringer (Hypoxanthin 680,5 mg/l; Thymidin 193,8 mg/l).

30

35

40

1 % Zusatz (v/v) einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (Seromed) (10'000 E Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin).

45

50

D) BSS-Puffer (Earle's Salzlösung, ohne Ca und Mg, pH 7,4)	
KCl	7,3 mM
NaCl	116 mM
NaHCO ₃	26 mM
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1 mM
Glucose	5,5 mM
Phenolrot	48 µM

E) Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,6)	
Na ₂ CO ₃	477 mg
NaHCO ₃	879 mg
NaN ₃ (0,5M)	1,8 ml
ad 300 ml H ₂ O	

55

EP 0 365 818 A1

5

F) PBS-Puffer (pH 7,0)		
NaCl	8,5 g	
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,28 g	
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0,436 g	
ad 1000 ml H ₂ O		

10

G) PBS-Tween-20 (0,1 %)

1 ml Tween-20 (Serva) + 1000 ml PBS

15

H) PBS-BSA (1 %)		
BSA	5 g	
NaN ₃ (0,5M)	3 ml	
ad 500 ml PBS		

20

25

I) Substrat-Puffer (Diethanolamin-Puffer, pH 9,8)		
Diethanolamin	97 ml	
NaN ₃ (0,5M)	6 ml	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100 mg	

30

ad 1000 ml H₂O, Einstellen des pH-Wertes auf pH 9,8 mit HCl conc. Herstellung des Substrates:
35 Unmittelbar vor Gebrauch wird eine Substrattablette (=5 mg) des p-Nitrophenylphosphat-Substrates
(Sigma-104) in 5 ml Substratpuffer gelöst.

40

45

50

55

Tabelle 1

Kreuzreaktivität verschiedener s-Triazin und Hydroxytriazin Analoger mit einem Anti-Atrazin MAb (MAb 4063-21-1) und zwei Anti-Hydroxyatrazin MAb (MAb 4009-85-3 and MAb 4009-77-20)						
Inhibitor	MAb 4063-21-1 (ECACC 8808/2501)		MAb 4009-85-3 (ECACC 8808/2503)		MAb 4009-77-20 (ECACC 8808/2502)	
	I 50 ng/ml (a)	% cross-reactivity (b)	I 50 ng/ml (a)	% cross-reactivity (c)	I 50 ng/ml (a)	% cross-reactivity (c)
Atrazin	0,45	100,0	>1000	<0,1	>1000	<0,05
Propazin	0,5	90,0	>1000	<0,1	>1000	<0,05
Simazin	18	2,5				
Desmetyrin	90	0,5				
Terbutylazin	9	5,0				
Trietazin	4	11,3				
Ametryn	9	5,0	>1000	<0,1	>1000	<0,05
Atraton	7	6,4	>1000	<0,1	>1000	<0,05
Prometryn	0,8	56,3				
Simetryn	27	1,7				
Prometon	0,6	75,0				
OH-Atrazin	21	2,1	0,95	100,0	0,5	100,0
OH-Propazin	5,5	8,2	0,95	100,0	0,6	83,3
OH-Simazin	180	0,3	65	1,5	1,2	41,7
OH-Desmetyrin	360	0,1	8	11,9	0,7	71,4
OH-Terbutylazin	8	5,6	19	5,0	3,3	15,2

a) Inhibitorkonzentration für 50 %ige Hemmung im kompetitiven ELISA-Test

b) Kreuzreaktivität, definiert als: (Atrazinkonzentration für 50 %ige Hemmung)/(Konzentration der s-Triazinanalogen für 50 %ige Hemmung) x 100

c) Kreuzreaktivität, definiert als: (Hydroxyatrazinkonzentration für 50 %ige Hemmung)/(Konzentration der s-Triazinanalogen für 50 %ige Hemmung) x 100

35

40

45

50

55

Tabelle II.

Erdprobe	Bodenzusammensetzung				pH	Hydroxyatrazin Zugabe (ppb)	Hydroxyatrazin Rückgewinnungsrate (%) MAB 4009-85-3 (ECACC 8808/2503)
	% Humus	% Sand	% Schlick	% Lehm			
Risilon (Israel)	1,8	80,8	3,8	13,6	7,8	20 60 200 600	91 92 90 93
Vetroz (Schweiz)	9,3	18,1	60,4	21,5	7,3	100	97
Stein (Schweiz)	5	43	17,4	34,6	7,1	100	110
Collombey (Schweiz)	1,4	83,9	13,6	2,5	7,4	100	107
Les Etolettes (Schweiz)	2,6	25,7	64	10,3	6,2	100	94

*angereichert Bodenextrakte (Methanol-Extrakte) werden 1:40 in PBS-Tween (0,1 %) für die ELISA Bestimmung verdünnt.

Tabelle III.

Bestimmung von Atrazin in Wasserproben				
Vergleich zwischen HPLC und ELISA (MAb 4063-21-1; ECACC 8808/2501)				
	Wasserprobe	HPLC		Verhältnis ELISA/HPLC
		Atrazin µg/l	Desethylatrazin µg/l	
5	1	0,09	0,05	1,1
10	2	0,10	0,15	1,4
15	3	0,41	0,59	0,9
20	4	0,10	0,11	1,5
25	5	0,08	0,06	1,4
30	6	0,06	0,05	1,5
35	7	<0,05	0,11	>1,0
40	8	<0,05	0,05	>1,0
45	9	0,06	<0,05	1,2
50	10	<0,05	<0,05	>1,0
55	11	<0,05	<0,05	>1,0
60	12	0,14	0,29	0,7
65	13	0,23	0,14	0,8
70	14	0,23	0,13	1,5
75	15	0,23	0,13	1,0
80	16	0,36	0,24	1,4
85	17	0,35	0,23	1,2
90	18	0,40	0,24	0,8
95	19	0,40	0,27	1,0
100	20	0,50	0,32	1,0
105	21	0,45	0,29	1,2
110	Kontrolle H ₂ O (HPLC)			0,01

35

40

45

50

65

Literatur

- 5 Ercegovich CD et al, J. Agric. Food Chem., 29: 559-563, 1981
 Fleeker J, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70: 874-878, 1987
 Hsu HT et al, ASM News, 50 (3): 91-101, 1984
 Kawamura H, Berzofsky JA, J. Immunol., 136: 58, 1986
 10 Kelley M et al, J. Agric. Food Chem., 33: 962-965, 1985
 Köhler G, Milstein, Nature, 256: 495-497, 1975
 Kulkarni NP et al, Cancer Res., 41: 2700-2706, 1981
 Littlefield JW, Science, 145: 709, 1964
 Newsome WH, J. Agric. Food Chem., 33: 528-530, 1985
 15 Raab GM, Clin. Chem., 29: 1757-1761, 1983
 Ramsteiner KA, Hörmann WD, J. Agric. Food Chem., 27: 934-938, 1979
 Ramsteiner K, "Atrazin". In Methodensammlung zur Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln; Deutsche Forschungsgemeinschaft Ed.; Verlag Chemie, 1985; Methode 6-D
 Shulman M et al, Nature, 276: 269-270, 1978.
 20 Wie SI, Hammock BD, J. Agric. Food Chem., 30: 949-957, 1982

Patentliteratur

US-P 4,530,786

25

Ansprüche

1. Eine Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweist und der im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit den inaktiven Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigt.
2. Eine Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber den Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweist und der im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigt.
3. Eine Hybridomazelllinie gemäss Anspruch 1, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin aufweist und der im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Hydroxyatrazin oder anderen Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten zeigt.
4. Eine Hybridomazelllinie gemäss Anspruch 3, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin aufweist und der eine ausgeprägte Kreuzreakтивität mit strukturell ähnlichen Atrazinderivaten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Propazin, Prometryn und Prometon, zeigt, der aber im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit anderen Atrazinderivaten oder Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweist.
5. Eine Hybridomazelllinie gemäss Anspruch 4, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2501 besitzt.
6. Eine Hybridomazelllinie gemäss Anspruch 2, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Hydroxyatrazin aufweist und der im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigt.
7. Eine Hybridomazelllinie gemäss Anspruch 6, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Hydroxyatrazin aufweist und der eine stark ausgeprägte Kreuzreakтивität mit Hydroxypropazin zeigt, der aber im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Hydroxyanalogen anderer Atrazinderivate oder mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigt.
8. Eine Hybridomazelllinie gemäss Anspruch 6, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Hydroxyatrazin aufweist und der eine Kreuzreakтивität mit Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten zeigt, der aber im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigt.
9. Hybridomazelllinie gemäss Anspruch 7, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2503 besitzt.
10. Hybridomazelllinie gemäss Anspruch 8, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC

8808/2502 besitzt.

11. Mutanten und Varianten einer Hybridomazelllinie gemäss einem der Ansprüche 1 bis 10, die noch die charakteristischen Eigenschaften des Ausgangsmaterials aufweisen; d.h. die noch in der Lage sind die erfindungsgemässen Antikörper zu synthetisieren und ins umgebende Medium zu sezernieren.
- 5 12. Monoklonale Antikörper und deren Derivate, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweisen und die im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit den inaktiven Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigen.
13. Monoklonale Antikörper und deren Derivate, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber den inaktiven Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweisen und die im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigen.
- 10 14. Monoklonale Antikörper und deren Derivate gemäss Anspruch 12, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin aufweisen und die im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Hydroxyatrazin oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten zeigen.
- 15 15. Monoklonale Antikörper und deren Derivate gemäss Anspruch 12, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Atrazin aufweisen und die eine stark ausgeprägte Kreuzreakтивität mit strukturell ähnlichen Atrazinderivaten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Propazin, Prometryn und Prometon zeigen, die aber im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit anderen Atrazinderivaten oder mit Hydroxyanalogen von Atrazin und/oder Atrazinderivaten aufweisen.
- 20 16. Monoklonale Antikörper und deren Derivate gemäss Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Kreuzreakтивität mit Propazin mehr als 80 % beträgt.
17. Monoklonale Antikörper und deren Derivate gemäss Anspruch 13, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Hydroxyatrazin aufweisen und die im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigen.
- 25 18. Monoklonale Antikörper und deren Derivate gemäss Anspruch 17, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Hydroxyatrazin aufweisen und die eine Kreuzreakтивität mit Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten zeigen, die aber im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigen.
- 30 19. Monoklonale Antikörper und deren Derivate gemäss Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Kreuzreakтивität mit Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten wenigstens 40 % beträgt.
- 20 20. Monoklonale Antikörper und deren Derivate gemäss Anspruch 17, die eine hohe Spezifität und Affinität gegenüber Hydroxyatrazin aufweisen und die eine stark ausgeprägte Kreuzreakтивität mit Hydroxypropazin zeigen, die aber im wesentlichen keine Kreuzreakтивität mit Hydroxyanalogen anderer Atrazinderivate oder mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten zeigen.
- 35 21. Monoklonale Antikörper und deren Derivate gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Kreuzreakтивität mit Hydroxypropazin bis zu 100 % beträgt.
22. Monoklonaler Antikörper und deren Derivate, die von einer Hybridomazelllinie gemäss einem der Ansprüche 1 bis 10 produziert werden.
- 35 23. Monoklonaler Antikörper und Derivate davon gemäss Anspruch 15, der von einer Hybridomazelllinie produziert wird, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2501 besitzt.
- 40 24. Monoklonaler Antikörper und Derivate davon gemäss Anspruch 18, der von einer Hybridomazelllinie produziert wird, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2502 besitzt.
- 25 25. Monoklonaler Antikörper und Derivate davon gemäss Anspruch 21, der von einer Hybridomazelllinie produziert wird, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2503 besitzt.
- 45 26. Verfahren zur Herstellung einer Hybridomazelllinie gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - a) Atrazin und/oder ein Atrazinderivat oder Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyanaloge von Atrazinderivaten mit einem Carriermolekül konjugiert
 - b) ein Donor-Tier mit besagtem Konjugat immunisiert
 - c) eine immunkompetente B-Zelle aus dem immunisierten Donor-Tier isoliert
 - 50 d) besagte immunkompetente B-Zelle mit einer zur kontinuierlichen Zellteilung befähigten Tumorzelllinie fusioniert
 - e) das entstehende Fusionsprodukt isoliert, in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert und anschliessend kloniert und
 - f) die klonierten Hybridzellen auf die Bildung monoklonaler Antikörper hin untersucht.
- 55 27. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man als Carriermolekül makromolekulare Verbindungen verwendet, die frei zugängliche reaktive Gruppen für die Kupplungsreaktion mit Atrazin und/oder Atrazinderivaten oder Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten aufweisen und die in der Lage sind besagten Verbindungen eine immunogene Potenz zu verleihen.

28. Verfahren gemäss Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass man ein lysinreiches Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 10'000 und 1'500'000 verwendet.
29. Verfahren gemäss Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Protein ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Bovine Serum Albumin" (BSA), "Keyhole Limpet Protein" (KLP), Humanes Serumalbumin (HSA), "Porcine Thyroglobulin", B2 Microglobulin, Hemocyanin, Immunoglobuline; Toxine; Polysaccharide; Lipopolysaccharide; natürliche oder synthetische Polyadenyl- und Polyuridylsäuren; Polyalanyl- und Polylysyl-Polypeptide; oder Zellmembrankomponenten verwendet.
- 5 30. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Konjugation an das Carriermolekül direkt erfolgt.
- 10 31. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Konjugation an das Carriermolekül über ein Brückenglied (Spacer) erfolgt.
32. Verfahren gemäss Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes Brückenglied eine oder mehrere reaktive Gruppen besitzt, die in der Lage sind mit den reaktiven Gruppen des Carriermoleküls in Wechselwirkung zu treten.
- 15 33. Verfahren gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten reaktiven Gruppen um Carboxyl-, Amino- oder SH-Gruppen handelt.
34. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Kupplungsreaktion mit Hilfe der aktiven Estermethode durchgeführt wird.
- 20 35. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Immunisierung der Donor-Tiere durch ein- bis mehrmalige Applikation von Carrier-gebundenem Atrazin und/oder Atrazinderivaten erfolgt.
36. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Immunisierung der Donor-Tiere durch ein oder mehrmahlige Applikation von Carrier-gebundenem Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten erfolgt.
- 25 37. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Applikation in Form einer intravenösen, intraperitonealen oder subcutanen Injektion erfolgt.
38. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Fusion immunkompetenter Zellen aus dem Donor-Tier Tumorzelllinien verwendet, die selbst keine monoklonalen Antikörper produzieren.
- 30 39. Verfahren gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass man Myelomazelllinien verwendet, die die kennzeichnenden Charakteristika von Sp2/0-Ag14 oder X63-Ag8.653 besitzen.
- 40 40. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man als Fusionsmedium eine Pufferlösung verwendet, die eines der üblicherweise für die Fusionierung von Zellen verwendeten Fusionspromotoren enthält ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Sendai Viren oder andere Paramyxoviren, Calcium-Ionen, oberflächenaktive Lipide oder Polyethylenglykol.
- 35 41. Verfahren gemäss Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Fusionspromotoren um Polyethylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 600 bis 6000 handelt.
42. Verfahren gemäss Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Polyethylenglyolkonzentration im Fusionssmedium 30 % - 60 % beträgt.
43. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Selektion fusionierte 40 Hybridzellen das HAT-Selektionsmedium verwendet.
44. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man die Hybridzellen in Gegenwart von isolierten Makrophagen ("Feederzellen") kultiviert.
- 45 45. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man positive, monoklonale Antikörper produzierende Hybridzellkulturen mit Hilfe des limitierenden Verdünnungsverfahrens vereinzelt und anschliessend in geeigneten Kultivierungsmedien kloniert.
46. Verfahren gemäss Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man die gemäss Anspruch 45 klonierten Hybridoma-Zellklone mit Hilfe eines Immunoassays auf die Bildung geeigneter monoklonaler Antikörper hin untersucht.
- 50 47. Verfahren gemäss Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Enzym-gekoppelten Immunassay oder einen Radioimmunassay verwendet.
48. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, dass man die gemäss einem der Ansprüche 26 bis 42 hergestellten Hybridomazelllinien in vivo oder in vitro mit Hilfe bekannter Verfahren kultiviert und die produzierten monoklonalen Antikörper isoliert.
49. Verfahren gemäss Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass man eine in vitro-Kultivierung in geeigneten Kultivierungsmedien durchführt.
- 55 50. Verfahren gemäss Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass man standardisierte Kulturmedien verwendet ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM) oder RPMI 1640, die gegebenenfalls durch Zugabe von Säuger-Seren, durch wachstumsfördernde Zusätze oder

durch Spurenelemente ergänzt werden können.

51. Verfahren gemäss Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass man besagte monoklonale Antikörper durch Expansion der gemäss einem der Ansprüche 23 bis 39 hergestellten Hybridomazelllinien in einem Donor-Tier *in vivo* herstellt.

5 52. Verfahren zum immunologischen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten, dadurch gekennzeichnet, dass man einen monoklonalen Antikörper gemäss einem der Ansprüche 12 oder 14 bis 16 in einem der bekannten Immunassays verwendet.

10 53. Verfahren zum immunologischen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten gemäss Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, dass man einen monoklonalen Antikörper, der von einer Hybridomazelllinie produziert wird, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2501 besitzt oder von Klonen oder Subklonen davon, in einem der bekannten Immunassays verwendet.

15 54. Verfahren zum immunologischen Nachweis von Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyatrazinderivaten, dadurch gekennzeichnet, dass man einen monoklonalen Antikörper gemäss einem der Ansprüche 13 oder 17 bis 21 in einem der bekannten Immunassays verwendet.

20 55. Verfahren zum immunologischen Nachweis von Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyatrazinderivaten gemäss Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass man einen monoklonalen Antikörper, der von einer Hybridomazelllinie produziert wird, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2502 besitzt oder von Klonen oder Subklonen davon, in einem der bekannten Immunassays verwendet.

25 56. Verfahren zum immunologischen Nachweis von Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyatrazinderivaten gemäss Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass man einen monoklonalen Antikörper, der von einer Hybridomazelllinie produziert wird, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2503 besitzt oder von Klonen oder Subklonen davon, in einem der bekannten Immunassays verwendet.

30 57. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 52 bis 56, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen kompetitiven Immunassay handelt.

25 58. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 52 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagtem Immunassay um einen Radioimmunassay (RIA), einen enzymgekoppelten Assay (ELISA) oder einen Chemolumineszenzassay handelt.

35 59. Mittel zum immunologischen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten in Form eines gebrauchsfertigen Test-Kits, dadurch gekennzeichnet, dass besagter Test-Kit neben den üblicherweise verwendeten Trägermaterialien, Reagentien und sonstigen Zusätzen mindestens einen monoklonalen Antikörper gemäss einem der Ansprüche 12 oder 14 bis 16 als Reagenz enthält.

60. Mittel zum immunologischen Nachweis von Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten in Form eines gebrauchsfertigen Test-Kits, dadurch gekennzeichnet, dass besagter Testkit neben den üblicherweise verwendeten Trägermaterialien, Reagentien und sonstigen Zusätzen mindestens einen monoklonalen Antikörper gemäss einem der Ansprüche 13 oder 17 bis 21 als Reagenz enthält.

35 61. Mittel zum immunologischen Nachweis von Atrazin und/oder Atrazinderivaten in Form eines gebrauchsfertigen Test-Kits gemäss Anspruch 59, dadurch gekennzeichnet, dass besagter Test-Kit neben den üblicherweise verwendeten Trägermaterialien, Reagentien und sonstigen Zusätzen mindestens einen monoklonalen Antikörper enthält, der von einer Hybridomazelllinie, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2501 besitzt oder von Klonen oder Subklonen davon, produziert wird.

40 62. Mittel zum immunologischen Nachweis von Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten in Form eines gebrauchsfertigen Test-Kits gemäss Anspruch 60, dadurch gekennzeichnet, dass besagter Test-Kit neben den üblicherweise verwendeten Trägermaterialien, Reagentien und sonstigen Zusätzen mindestens einen monoklonalen Antikörper als Reagenz enthält, der von einer Hybridomazelllinie, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2502 besitzt oder von Klonen oder Subklonen davon, produziert wird.

45 63. Mittel zum immunologischen Nachweis von Hydroxyatrazin und/oder Hydroxyanalogen von Atrazinderivaten in Form eines gebrauchsfertigen Test-Kits gemäss Anspruch 60, dadurch gekennzeichnet, dass besagter Test-Kit neben den üblicherweise verwendeten Trägermaterialien, Reagentien und sonstigen Zusätzen mindestens einen monoklonalen Antikörper als Reagenz enthält, der von einer Hybridomazelllinie, welche die kennzeichnenden Charakteristika von ECACC 8808/2503 besitzt oder von Klonen oder Subklonen davon, produziert wird.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 11 7109

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
A,D	US-A-4 530 786 (B.D. DUNBAR et al.) * Spalte 3, Zeile 12 - Spalte 4, Zeile 32; Spalte 5, Zeile 5 - Spalte 6; Zeile 67 *	27-37, 47,57	G 01 N 33/53 G 01 N 33/94 G 01 N 33/577 C 12 P 21/00
Y,D	---	1-63	
Y,D	JOURNAL OF AGRICULTURAL & FOOD CHEMISTRY, Band 33, Nr. 3, 1985, Seiten 528-530, American Chemical Society, Washington, DC, US; W.H. NEWSOME: "An enzyme-linked immunosorbent assay for metalaxyl in foods" * Seite 530, Spalte 2, Zeilen 4-6 *	1-63	
X,P	EP-A-0 300 381 (Dr. PFEIFFER BIOANALYTIK) * Gesamt *	1-63	
Y	---	1-63	
Y	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Band 80, Nr. 11, 1985, Zusammenfassung Nr. 97998, Philadelphia, PA, US; S.J. HUBER et al.: "A solid-phase enzyme immunoassay for quantitative determination of the herbicide terbutryna", & Z. PFLANZENKR. PFLANZENSCHUTZ. 92(2): 147-156. 1985	1-63	
Y	---	1-63	G 01 N C 12 P
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 104, Nr. 11, 17. März 1986, Seite 228, Zusammenfassung Nr. 83639e, Columbus, Ohio, US; S.J. HUBER: "Improved solid-phase enzyme immunoassay systems in the ppt for atrazine in fresh water", & GHEMOSPHERE 1985, 14(11-12), 1795-803	1-63	
	---	-/-	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	11-01-1990	VAN BOHEMEN C.G.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		
A : technologischer Hintergrund	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument		
O : nichtschriftliche Offenbarung	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument		
P : Zwischenliteratur	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Seite 2

Nummer der Anmeldung

EP 89 11 7109

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
Y	<p>BULLETIN ON ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY, Band 40, 1988, Seiten 647-654, New York, NY, US; R.J. BUSHWAY et al.: "Determination of atrazine residues in water and soil by enzyme immunoassay" * Seite 652, tabelle 6 *</p> <p>-----</p>	1-63	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p>			
Recherchenart	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	11-01-1990	VAN BOHEMEN C.G.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			